

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

“EVALUACIÓN DE UNA CELDA PARA LA GENERACIÓN DE VAPOR FRIO DE CADMIO Y SU DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE ORINA MEDIANTE ESPECTROMÉTRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA”

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la ilustre
Universidad Central de
Venezuela por la Br. Nairobi
Pescador para optar al título de
Licenciado en química

Caracas, Abril 2009

RESUMEN

En este trabajo se evaluó una celda de reacción para la generación de vapor frío de cadmio. Asimismo, se optimizó una metodología aplicable a la determinación de cadmio en muestras de orina mediante CV-AAS.

Para ello, se optimizaron los parámetros físicos correspondientes al diseño de la celda y su ensamblaje para la introducción apropiada de la muestra y los reactivos. Los parámetros que intervienen en la formación de la especie volátil de cadmio también fueron optimizados, tanto en muestras de orina como en soluciones acuosas, empleando dos aproximaciones: un diseño factorial multivariado Box Behnken de cuatro factores a dos niveles y un análisis univariado. Los resultados obtenidos bajo las condiciones óptimas, en cada caso, fueron comparados en base al límite de detección, porcentaje de recuperación y valor de concentración promedio. Asimismo, se determinó la exactitud y la precisión de la metodología.

Bajo las condiciones optimizadas mediante el método multivariado (2,78% m/v de ácido clorhídrico, 3,5 mg L⁻¹ de Co, 5,90 % m/v tiourea y 7,0 % m/v del agente reductor) y mediante el método univariado (2,8% m/v de ácido clorhídrico, 2 mg L⁻¹ de Co, 4 % m/v tiourea y 7,0 % m/v del agente reductor) se obtuvieron límites de detección instrumental de 1,11 µg L⁻¹ y 0,96 µg L⁻¹, respectivamente. El porcentaje de recuperación instrumental obtenido mediante ambos procedimientos fue comparable y se encuentra dentro del intervalo del 91% y 98%. Tampoco se encontraron diferencias significativas (P=0,05) entre los valores de concentración de Cd determinados en muestras de orina provenientes de donantes voluntarios.

Los resultados de la concentración de Cd obtenidos en una muestra control de orina, Lyphocheck Nivel 1 de Bio-rad, bajo las condiciones experimentales optimizadas

mediante el modo multivariado, estuvieron de acuerdo con los valores establecidos por el fabricante, mostrando un coeficiente de variación del 2,1% para tres réplicas.

Los resultados obtenidos muestran que la celda diseñada y operada bajo las condiciones de análisis optimizadas, permite la obtención del vapor metálico de cadmio y su determinación en muestras de orina de manera cuantitativa y con una buena precisión. Los LOD obtenidos pueden ser mejorados realizando modificaciones adicionales dirigidas hacia la disminución del volumen muerto que diluye el vapor metálico generado.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mis hermanos Paolita, Kathe, Anita y Germán, por la orientación impartida a lo largo de vida, en mi desarrollo personal y profesional, por todo el apoyo que me han brindado y el que me seguirán brindando a lo largo de mi vida, los quiero mucho. Todos son un orgullo para mí, de cada uno he adquirido un poco para seguir adelante en la lucha de la vida. A mis sobrinos, Patricia, Borre Andre, Alejandra y Oliver, por alegrarme los días y distraerme sin previo aviso.

A mis tutores, la Prof María de los Ángeles por haberme brindado su apoyo antes, durante y después del desarrollo de mi tesis, una tutora como ninguna. Al Prof. José Alvarado por haber depositado su confianza en mí y haberme prestado su apoyo tanto como profesional, como amigo.

Al Prof. José Domínguez, por haberme cuidado como un padre durante todo este tiempo, por siempre estar pendiente de mí y ayudarme con sus consejos oportunos.

A mis grandes amigos, incondicionales en todo momento, Danny, Ana, Valeria, Héctor cat, Edgar, mi partner Jaime, Matilde, Eloy, Enrique, Beldry, Gaby y Nally, que siempre han estado allí para reírse conmigo, ayudarme y darme su apoyo cuando los obstáculos en el camino han sido bastante grandes. Así como también quiero agradecer a otros de mis amigos, aquellos que conocí durante mi vida y mi carrera, algunos de los cuales por alguna u otra razón están distantes, pero están allí; Saimón, Lina, Hari, Dane, Yusbeika, Oscar, Karina, Ivan, Hector, Alfredo, Juan Manuel, José Ramón, Mariela.

A Lili y a Ive, dos grandes amigas que conocí al inicio de mi tesis, a las cuales debo agradecer mucho por haberme ayudado y orientado tanto durante todo este tiempo.

A mi loquito, amigo incondicional, confidente y demás, que ha pasado a formar parte importante de mi vida, que me ha sabido comprender y valorar, dándome palabras de aliento cuando más las necesito. Que me ha enseñado muchas cosas y ha compartido conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por estar presente en mi vida.

INDICE

RESUMEN.....	<i>iii</i>
AGRADECIMIENTOS.....	<i>v</i>
INDICE.....	<i>vi</i>
INDICE DE TABLAS.....	<i>lx</i>
INDICE DE FIGURAS.....	<i>xi</i>
I INTRODUCCIÓN.....	1
II MARCO TEÓRICO.....	3
1 Generalidades acerca del cadmio.....	3
1.1 Usos del cadmio.....	3
1.2 Toxicidad y efectos del cadmio en la salud.....	4
1.3 Técnicas espectrométricas para la determinación de cadmio.....	7
1.3.1 Sistemas de generación química de vapor o especies volátiles.....	8
1.3.1.1 Generación de vapor frío.....	8
1.4 Antecedentes de la generación de especies volátiles y vapor frío de cadmio.....	16
1.5 Instrumentación empleada en la generación de especies volátiles.....	19
III OBJETIVOS.....	24
1 General.....	24
2 Específicos.....	24

IV	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	25
1	Instrumentación.....	25
2	Reactivos.....	27
3	Procedimiento Experimental.....	27
V	RESULTADOS.....	32
1	Resultados preliminares.....	32
2	Optimización Univariada.....	40
3	Estudio del comportamiento de la señal analítica en función de dos modos de medición: Running mean e integración.....	46
4	Optimización multivariada.....	48
VI.	CONCLUSIONES.....	56
VII.	BIBLIOGRAFIA.....	57
VIII.	APENDICE.....	61
	Apéndice 1: Experiencias del diseño Box Behnken de cuatro factores, dos niveles.....	61
	Apéndice 2: Valores estimados de los efectos considerados en el diseño Box Behnken, empleado una muestra de orina contaminada con $40 \mu\text{g L}^{-1}$	62
	Apéndice 3: Análisis de varianzas para valores de los efectos considerados en el diseño Box Behnken, empleado una muestra de orina contaminada con $40 \mu\text{g L}^{-1}$	62
	Apéndice 4: Valores estimados de los efectos considerados en el diseño Box Behnken, empleando un patrón acuoso de $40 \mu\text{g L}^{-1}$	63

Apéndice 5: Análisis de varianzas para valores de los efectos considerados en el diseño Box Behnken, empleado un patrón acuoso de $40 \mu\text{g L}^{-1}$	63
Apéndice 6: Gráfica de Pareto de los efectos de los factores A, B, C, y D involucrados en la generación del vapor frío de cadmio empleando un patrón acuoso de $40 \mu\text{g L}^{-1}$	64
Apéndice 7: Superficies de respuesta obtenidas en el patrón acuoso. Nota: la concentración de las lecturas se muestra en valores codificados.....	65
Apéndice 8: Ecuaciones empleadas para el cálculo de las figuras de mérito.	66

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Límites de detección para cadmio mediante diferentes técnicas espectrométricas.....	7
Tabla 2: Parámetros optimizados en la generación del vapor frío de cadmio.....	29
Tabla 3: Niveles y factores del diseño Box-Behken para analizar los efectos de los parámetros ácido clorhídrico, cobalto, tiourea y borohidruro de sodio en la señal del vapor frío de cadmio.....	29
Tabla 4: Condiciones iniciales de trabajo tanto químicas como físicas para la generación del vapor frío de cadmio.....	33
Tabla 5: Nuevas condiciones de trabajo para generar la especie volátil de cadmio.....	37
Tabla 6: Concentraciones óptimas de los reactivos utilizados obtenidas mediante el método univariado.....	44
Tabla 7: Concentración de cadmio determinadas en muestras de orina mediante la optimización univariada de los parámetros.....	46
Tabla 8: Valores óptimos determinados con el diseño BoxBehken.....	49
Tabla 9: Concentración de cadmio en las muestras de orina y sus respectivos porcentajes de recuperación, obtenidas mediante la optimización multivariada de los parámetros.....	52

Tabla 10: Comparación entre los métodos de optimización empleados.....	53
Tabla 11: Porcentajes de recuperación obtenidos en la determinación de cadmio en la muestra control de orina Lyphochek Bio Rad Nivel 1.....	55

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Diagrama de inyección en flujo continuo empleado para la generación de vapor frío de mercurio, en el cual se muestra que el mechero es utilizado únicamente como soporte para la T de vidrio o cuarzo, es decir, que durante el desarrollo de la metodología la llama se mantiene apagada.	13
Figura 2: Celda de Reacción empleada por Sanz Medel y colaboradores para generar la especie volátil de cadmio	21
Figura 3: Diseño de celda de reacción empleado por Maleki y colaboradores para llevar a cabo la generación de la especie volátil de plomo.....	22
Figura 4: Celda de reacción empleada por Murillo L, para la generación de CV- Hg.....	22
Figura 5: Celda de reacción y sus partes.....	25
Figura 6: Horno de microondas modificado.....	26
Figura 7: Modelos de celdas de reacción.....	33
Figura 8: Señales obtenidas para la especie volátil de cadmio generada a partir de las condiciones citadas en la tabla 3. Concentración del ácido 1,0 mol L ⁻¹	34
Figura 9: Celda de reacción sujeta a una pieza metálica para proporcionarle estabilidad.....	35
Figura 10: Señales obtenidas para la especie volátil de cadmio a diferentes concentraciones empleando el panel de lecturas continuas.....	36

Figura 11. Señal obtenida para una solución patrón de cadmio de $80 \mu\text{g g}^{-1}$, empleando el modo de medición Running mean.....	37
Figura 12: Celda de reacción reconstruida con separador gas-líquido de mayor capacidad (aproximadamente 2,5 mL).....	38
Figura 13: Celda de reacción con mangueras incorporadas para mejorar la inyección del agente reductor.....	39
Figura 14: Optimización de la concentración de HCl en la solución mezcla.....	41
Figura 15: Optimización de la concentración de tiourea en la solución mezcla.....	42
Figura 16: Optimización de la concentración de cobalto en la Solución mezcla.....	43
Figura 17: Optimización de la concentración del agente reductor.....	44
Figura 18: Curva de calibración para el cadmio bajo las condiciones optimizadas de manera univariada.....	45
Figura 19: Curvas de calibración para cadmio obtenidas mediante dos modos de medición, Running mean e integración.....	47
Figura 20: Gráfica de Pareto para estudiar los efectos de la concentración de los factores A, B, C, y D involucrados en la generación del vapor frío de cadmio empleando un patrón de 40 ppb con muestra.....	48
Figura 21: Superficies de respuesta de los distintos efectos combinados de los factores que intervienen en la generación de la especie volátil de cadmio. La concentración de las lecturas se muestra en valores codificados.....	49
Figura 22: Curva de calibración para cadmio obtenida bajo las condiciones optimizadas de manera multivariada.....	51

INTRODUCCION

Entre los metales que representan mayor toxicidad para los seres humanos se encuentran el plomo (Pb), el mercurio (Hg) y el cadmio (Cd), los cuales se encuentran en el grupo de los metales pesados. Estos y otros metales o diferentes compuestos de éstos, tanto orgánicos como inorgánicos o sus respectivas sales, tienen la propiedad de aumentar su concentración en organismos biológicos a través del tiempo, de acuerdo a la capacidad que tenga el organismo de excretarlos; de esta manera se acumulan en ciertos órganos del cuerpo trayendo como consecuencia diversos daños, entre los cuales se pueden mencionar efectos agudos y crónicos en los sistemas nervioso central, reproductivo e inmune, trayendo como consecuencia problemas neurológicos, cardiovasculares, renales, gastrointestinales, hematológicos y reproductivos ⁽¹⁾.

La toxicidad del cadmio y otros metales trae como consecuencia el desarrollo de nuevas técnicas que permitan determinar concentraciones cada vez más bajas, ya que los efectos tóxicos se observan a cantidades muy bajas, encontrándose trazas en el organismo. El objetivo principal que se busca con dichas técnicas es mejorar los límites de detección, realizar análisis en tiempos más cortos, disminuir los costos, así como también lograr que la instrumentación sea más sencilla. El desarrollo de técnicas de introducción de analitos mediante generación de especies en fase gaseosa para espectrometría atómica, tanto para absorción atómica (AAS) como para emisión atómica (AES), tales como la generación de hidruros y la generación de vapor frío de mercurio y cadmio, constituyen ejemplos de técnicas que cumplen con las características antes mencionadas, las cuales han sido investigadas en detalle ⁽²⁻⁴⁾ y

para las cuales se han determinado las diferentes figuras de mérito que garantizan la validez de los análisis realizados.

La generación del vapor frío de cadmio es una técnica bastante reciente. Hace años sólo se conocía la generación de vapor frío de mercurio, la que en la actualidad es una técnica muy conocida y aplicada a muchas muestras de diferente naturaleza ^(5,9). Con el transcurrir de los años, investigadores en búsqueda de nuevas técnicas que permitieran determinar cantidades cada vez más bajas, desarrollaron la técnica de generación de vapor frío de cadmio utilizando reactivos adicionales que faciliten la reacción entre éste y el borohidruro de sodio. Se desarrollaron también instrumentos adicionales tales como celdas de reacción para mejorar la eficiencia de dicha técnica arrojando resultados satisfactorios, los cuales han sido validados mediante diferentes figuras de mérito tales como la exactitud, con material de referencia certificado, precisión, realizando numerosas medidas a diferentes condiciones y límites de detección cada vez mas bajos.

El presente trabajo se centra en la evaluación de una celda de reacción para la generación de vapor frío de Cd como sistema de introducción de muestra y su determinación mediante espectrometría de absorción atómica.

MARCO TEÓRICO

1. Generalidades acerca del Cadmio

El Cadmio es el elemento químico de número atómico 48 situado en el grupo 12 de la tabla periódica. Este metal es maleable, grisáceo, y existe en su forma pura en la naturaleza, en rocas y suelos a niveles de concentración muy bajos ⁽³⁾. Por lo general se encuentra en el ambiente como un mineral combinado con otros elementos tales como el oxígeno (óxidos de cadmio), cloruros (cloruro de cadmio), o azufre (sulfito y sulfato de cadmio), éstas diferentes formas de compuestos de cadmio se encuentran en estado sólido como pequeñas partículas dispersas en el aire ⁽¹⁰⁾. El cadmio forma parte del grupo de metales pesados debido a que tiene una densidad mayor a 5 g/cm^{-3} (densidad $\text{Cd} = 8,65 \text{ g cm}^{-3}$) ⁽¹⁰⁾.

1.1 Usos del Cadmio

Tanto las aleaciones como los compuestos de cadmio, son usados en una gran variedad de productos comerciales e industriales. El uso de los compuestos de cadmio se puede dividir en cinco categorías ⁽¹⁰⁾:

- ❖ Principalmente en baterías de níquel-cadmio donde el cadmio representa el 70% del total del producto.
- ❖ Pigmentos, los cuales son usados en su mayoría en plásticos, cerámicas y vidrio, en los cuales el cadmio representa un 12 % del producto.

- ❖ Como estabilizadores del cloruro de polivinilo (PVC) contra la luz y el calor, para los cuales el cadmio usado representa un 17%.
- ❖ Revestimientos en acero y algunos metales no ferrosos, en los cuales el cadmio usado representa un 8 % del total del producto.
- ❖ Componente en diversas aleaciones específicas, donde el cadmio representa aproximadamente un 2 % del total de dichas aleaciones.

El carbonato y el cloruro de cadmio eran usados anteriormente como fungicidas para canchas de golf y césped, pero fueron prohibidos por la EPA al final de los años 80. La relevancia del cloruro de cadmio como un producto comercial ha disminuido, sin embargo, éste es usado para la preparación de sulfuro de cadmio en la manufacturación de espejos especiales y en pinturas para teñir. El sulfuro y el telurio de cadmio, son usados principalmente en celdas solares y en una gran variedad de artefactos electrónicos, los cuales dependen de las propiedades semiconductoras del cadmio. Las propiedades fotoconductoras y electroluminiscentes del sulfuro de cadmio han sido aplicadas en la manufacturación de una variedad de productos comerciales ⁽¹⁰⁾.

1.2 Toxicidad y efectos del Cadmio en la salud

Méndez-Armenta M., y Ríos C., (2007) ⁽¹¹⁾, en su trabajo acerca de la neurotoxicidad del cadmio, mencionan algunos daños producidos por el cadmio, entre los cuales hacen referencia a: el daño ocasionado en los pulmones de trabajadores expuestos al cadmio como la primera consecuencia en la salud humana relacionada a la exposición de este elemento (hecho publicado en 1983), además citan que Friberg (1948), reportó la presencia de proteinuria y enfisema en trabajadores de la industria de baterías de

cadmio y algunos años más tarde, después de la segunda guerra mundial en la población de Toyama-Japón, aparecieron fracturas patológicas de huesos y dolores severos denominados enfermedad Itai-Itai, como consecuencia a la exposición al cadmio.

Así como en el caso de otros metales, por ejemplo el mercurio y el arsénico, es importante conocer las formas en la que se encuentra el cadmio y la ruta de exposición, ya que dependiendo de las mismas, estas pueden afectar enormemente la absorción y distribución del elemento en varios sitios específicos, así como también la gravedad del efecto observado. La forma del cadmio que es de gran interés para los efectos sobre la salud vía inhalación son los óxidos, debido a que ésta es la forma principal transportada en el aire. Por ingestión, el cloruro de cadmio ha sido estudiado con frecuencia en animales debido a la alta solubilidad en agua y las altas concentraciones resultantes revelan los sitios específicos afectados. Estudios de los enlaces del cadmio con la metalotioneína (MT) también resultan de gran interés debido a que los complejos CdMT tienen diferentes perfiles tóxicos y son encontrados en relativamente grandes cantidades en órganos tales como hígado y riñones ⁽¹⁰⁾.

La intoxicación por cadmio puede darse tanto por inhalación como por ingestión ⁽¹²⁾, siendo la principal ruta de exposición al cadmio para la población en general no-fumadora por ingestión, mientras que la contribución por parte de otras vías al total es pequeña. La población fumadora resulta estar más expuesta a la contaminación por cadmio, debido a que el tabaco es una fuente primordial de este elemento ya que tiende a acumularlo a través de los suelos. Investigaciones en animales y humanos han mostrado que la absorción en los pulmones es mucho mayor que por vía gastrointestinal ⁽¹³⁾. Se ha determinado que mas del 50% del cadmio inhalado es

absorbido, mientras la absorción por vía gastrointestinal esta influenciada por el tipo de dieta y estatutos nutricionales ⁽¹³⁾.

Il`yasova, D. y Schwartz G (2004) ⁽¹⁴⁾, realizaron una recopilación de información acerca del vínculo existente entre el cadmio y el cáncer renal, para lo cual emplearon 7 estudios epidemiológicos y 11 estudios clínicos. Llegaron a la conclusión de que la exposición al cadmio parece estar asociada con el cáncer renal, aunque esta conclusión está sujeta a la falta de estudios para establecer algo concreto que incluya la exposición al elemento a través de muchas fuentes, entre ellas actividades como fumar y la dieta diaria. Estudios realizados tanto en animales como humanos, indicaron que el daño al esqueleto (osteoporosis) puede ser un efecto crítico debido a la exposición al cadmio, pero la significancia del efecto aún no esta clara ⁽¹³⁾.

La Occupational Safety Health Administration (OSHA) ⁽¹⁵⁾, expresa que los efectos primordiales y de mayor gravedad en la salud debido a la exposición al cadmio por largos períodos son la disfunción de los riñones, cáncer de pulmón y cáncer de próstata ⁽¹⁵⁾. Otros efectos debido a la exposición al cadmio son la interrupción del metabolismo del calcio y la formación de piedras en los riñones ⁽¹³⁾. Por ejemplo, los cambios en los pulmones están caracterizados por una enfermedad crónica que obstruye las vías respiratorias debido a la alta exposición en el ambiente ocupacional, mientras que cambios menores con continua exposición traen consigo insuficiencia respiratoria. Un incremento en la data de mortalidad a raíz de la enfermedad por obstrucción de los pulmones ha sido encontrado en trabajadores con alta exposición en el pasado ⁽¹³⁾. Cabe destacar que la Agencia Internacional para la búsqueda del Cáncer (IARC) clasifica el cadmio como carcinogénico, en la clase 1 ^(15,16).

1.3 Técnicas espectrométricas para la determinación de cadmio

Las siguientes técnicas, son las principales y generales para la determinación de iones metálicos y también aplicadas en el caso específico de cadmio. Estas son: espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS), espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS), espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES), espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado (ICP-MS), espectrometría de absorción atómica con; generación de hidruros (HG-AAS), generación química de vapor (CVG-AAS), generación de vapor (VG-AAS) y espectrometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros (HG-AFS). El cadmio también puede ser determinado como vapor frío medido por espectroscopía de absorción atómica (CV AAS). En la Tabla 1, se muestran algunas de las técnicas empleadas para la determinación de cadmio en muestras de diferente naturaleza y los respectivos límites de detección alcanzados.

Tabla 1: Límites de detección para cadmio mediante diferentes técnicas espectroscópicas.

TECNICA	LIMITE DE DETECCIÓN ($\mu\text{g L}^{-1}$)
FAAS ⁽¹⁷⁾	1
ETAAS ó GFAAS ⁽¹⁷⁾	0,0001
ICP-OES ⁽¹⁸⁾	0,3
ICP- MS ⁽¹⁹⁾	0,15
CVG-AAS ⁽²⁰⁾	0,026
VG-AFS ⁽²¹⁾	0,020

En el presente estudio, haremos énfasis en la técnica de generación de vapor frío de cadmio como método de introducción de muestra y su determinación mediante espectrometría de absorción atómica^(17, 22, 23) (CV-AAS).

1.3.1 Sistemas de generación metálica y química de vapor o especies volátiles.

Según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (1992)⁽¹⁶⁾, la generación química de vapor (CVG), es una técnica en la cual el analito es separado de la matriz, por la generación de especies gaseosas como resultado de una reacción química. Esta técnica ha adquirido su más amplia aplicación en AAS (también es usada en combinación con ICP-OES y AFS), en la forma de Cold Vapor o Vapor Frío (CV-AAS) para la determinación de mercurio y también como generación de hidruros (HG-AAS) para los elementos que forman hidruros covalentes en estado gaseoso (As, Bi, Ge, In, Pb, Sb, Se, Sn and Te). La generación de carbonilos, generación de halógenos y la generación de otras especies volátiles también han sido usadas en análisis espectroquímico. Las especies gaseosas generadas son introducidas usualmente con una corriente de gas, mediante un sistema de muestreo para las mediciones por AAS o ICP. Sin embargo, la mayoría de los autores, llaman a esta técnica “generación de especies volátiles” o “generación de vapor” (VG), definiéndola como una forma especializada de introducción de muestra en espectroscopía de absorción atómica para ciertos analitos, a partir de una solución acuosa⁽²¹⁾.

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada debido a que la generación de analitos en estado gaseoso y su introducción en sistemas de detección puede ofrecer ventajas significativas sobre métodos convencionales de nebulización neumática, permitiendo

determinar concentraciones de elementos por debajo de los $100 \mu\text{g g}^{-1}$ en una amplia variedad de matrices. Entre las ventajas que ofrece se pueden mencionar ^(24,26):

- ❖ Separación del analito de los componentes indeseables presentes en la matriz, lo cual conlleva a mejorar la selectividad y sensibilidad.
- ❖ Puede emplearse como un sistema de introducción de muestra mucho más eficiente que los sistemas de nebulización convencionales.
- ❖ Atomización eficiente, en el caso de la formación de una especie molecular.
- ❖ Empleo de instrumentación bastante sencilla y poco costosa (cuando se trabaja en los sistemas por carga y la determinación del elemento es realizada mediante AAS).

La generación de hidruros fue introducida alrededor de 1970 para superar los problemas asociados en la determinación de As y Se mediante AAS con llama ⁽⁷⁾. Además de estos dos elementos, existe un número considerable de metales difíciles de determinar empleando dicha técnica, debido a que sus líneas de resonancia de primer orden se encuentran a longitudes de onda próximas a 200 nm, zona en la que la absorción de los gases de la llama es bastante elevada. Algunos de estos elementos poseen la capacidad de formar hidruros volátiles como es el caso del As (AsH_3 o arsina) o un vapor atómico a temperatura ambiente como es el caso del Hg y el Cd, de modo que la generación del hidruro permite un transporte más eficiente del analito en forma de gas. Los hidruros se atomizan luego en celdas de cuarzo situadas en el camino óptico, y por consiguiente esta alternativa constituye la base de una determinación de tales elementos por AAS mucho más sensible que el método convencional, usando el nebulizador neumático ⁽²⁷⁾.

En la actualidad, la generación de hidruros es la técnica de generación de especies volátiles más ampliamente utilizada para la determinación de niveles traza de algunos elementos tóxicos. Dicha técnica emplea un reductor, como el borohidruro de sodio, para formar hidruros covalentes de los elementos mencionados anteriormente. La química de la generación de hidruros es muy conocida y ha sido bien documentada ^(3, 27-30), el uso del control de agentes redox, pH y agentes enmascarantes para dar un rendimiento óptimo la convierte una técnica bastante poderosa y aceptada ⁽²¹⁾.

Por años la aplicación de la generación de hidruros había estado limitada al grupo clásico de elementos tales como Hg, As, Sb, Bi, Se, Te, Ge, Sn, Pb. Sin embargo, en recientes años la técnica ha sido expandida, prestando más atención al desarrollo de la generación de especies volátiles de cinc y cadmio debido al importante rol que estos elementos representan en el ambiente y la salud humana ⁽²⁶⁾. En el proceso de generación de hidruros podrían distinguirse dos etapas, las cuales son: primero, la generación del hidruro, en el que se incluyen también su eliminación de la matriz y transporte al atomizador y segundo, la atomización del hidruro ⁽²⁷⁾.

Existen dos formas básicas de generar un hidruro las cuales son: transferencia directa y recogida ⁽²⁷⁾. En la transferencia directa, el hidruro liberado se transporta directamente al sistema atomizador, mientras que en el de recogida el hidruro se colecta para ser posteriormente liberado y transportado al atomizador. De los dos tipos, el de transferencia directa ha sido el más ampliamente utilizado y es en el cual haremos énfasis en el presente trabajo. Este último, se puede llevar a cabo mediante tres procedimientos clásicos, los cuales son: inyección por carga, inyección en flujo e inyección en flujo continuo ⁽²⁾.

❖ **Inyección por carga:** consiste en agregar un volumen conocido del analito en una celda de reacción y luego adicionar el agente reductor en medio ácido, al formarse el hidruro éste es transportado a la fuente de plasma por el gas de arrastre. Aplicando este procedimiento, Murillo, L., (2006) ⁽³¹⁾, realizó un trabajo basado en el desarrollo de nuevas celdas de reacción para la generación de compuestos volátiles de metales tóxicos y su determinación por espectrometría de absorción atómica. Para ello, diseñaron dos celdas en vidrio, una sin separador gas- líquido y la otra con separador gas-líquido, las cuales se utilizaron para determinar mercurio en muestras de orina. Con ambas celdas lograron obtener señales de mercurio en un intervalo de concentraciones de 10 a 80 ng mL⁻¹ utilizando borohidruro de sodio como agente reductor, obteniendo así un límite de detección de 4 ng mL⁻¹.

❖ **Inyección en flujo:** este procedimiento, a diferencia del anterior, utiliza una espiral de inyección que suministra un volumen de muestra definido que es arrastrado por una corriente ácida hasta la celda de reacción. Aplicando este procedimiento, Hwang, T (1997) ⁽³²⁾, realizó la determinación de cadmio por inyección en flujo- dilución isotópica-espectrometría de masa con plasma inductivamente acoplado con generación de vapor como sistema de introducción de muestra (FI-ID-ICP-MS-VG). Como resultado obtuvieron un límite de detección de 0,026 ng mL⁻¹ para el cadmio, aplicando dicho método a la determinación de este metal en sedimentos, orina y materiales certificados de agua. Llegaron a la conclusión de que el sistema de generación de vapor e inyección continua empleados como sistema de introducción de muestra para ICP-MS, fue bastante eficiente ya que se logró la separación del cadmio de la matriz y además de ello lograron reducir significativamente las interferencias con especies iónicas moleculares de molibdeno (MoO⁺) y zirconio (ZrO⁺).

❖ **Inyección en flujo continuo:** en este sistema, la muestra y el agente reductor son impulsados mediante una bomba peristáltica a una celda de reacción; el hidruro y el hidrógeno formados en la reacción son separados del líquido remanente, mediante un

separador gas-líquido, para luego ser transportados por el gas de arrastre hacia la zona de detección.

1.3.1.1 Generación de Vapor frío (CV-AAS)

Esta técnica se fundamenta en la generación del analito en estado atómico en estado gaseoso a temperatura ambiente, utilizando un agente reductor, tal como se realiza en la generación de especies volátiles, ya discutida. La generación de vapor atómico a temperatura ambiente, se ha referido fundamentalmente a la determinación de Hg debido a su alta presión de vapor. En las secciones siguientes se discutirá esta opción, con la finalidad de ilustrar los aspectos resaltantes de la misma y esperando que tales aspectos puedan ser aplicados también en la generación del vapor frío de cadmio, lo cual es el objetivo de este trabajo.

Vapor frío de mercurio

El método de vapor frío del mercurio, permite la determinación de dicho elemento sin necesidad de emplear la llama u otro sistema de atomización (de ahí el nombre de técnica del vapor frío, ver Figura 1), con una sensibilidad superior a la de los métodos convencionales. Esta metodología puede realizarse de distintas maneras ⁽²⁷⁾:

- i) Reducción en sistema abierto: la disolución se trata con un agente reductor apropiado y el vapor atómico de mercurio formado se transporta a la celda de atomización al igual que en la generación de hidruros.

- ii) Por pirólisis o combustión de la muestra con desprendimiento de Hg^0 .
- iii) Amalgama electrolítica: donde el mercurio se deposita sobre un cátodo de Cu durante un proceso de electrolisis, y se libera a continuación por calentamiento adecuado del cátodo.
- iv) Amalgama directa: se recoge el mercurio por cementación sobre una varilla de Ag o de Au y se libera por calentamiento. Este método se puede emplear como técnica de preconcentración junto a los métodos *ii* y *iii*.

El presente trabajo se refiere al método mencionado en primer lugar, el cual fue aplicado al caso específico del cadmio.

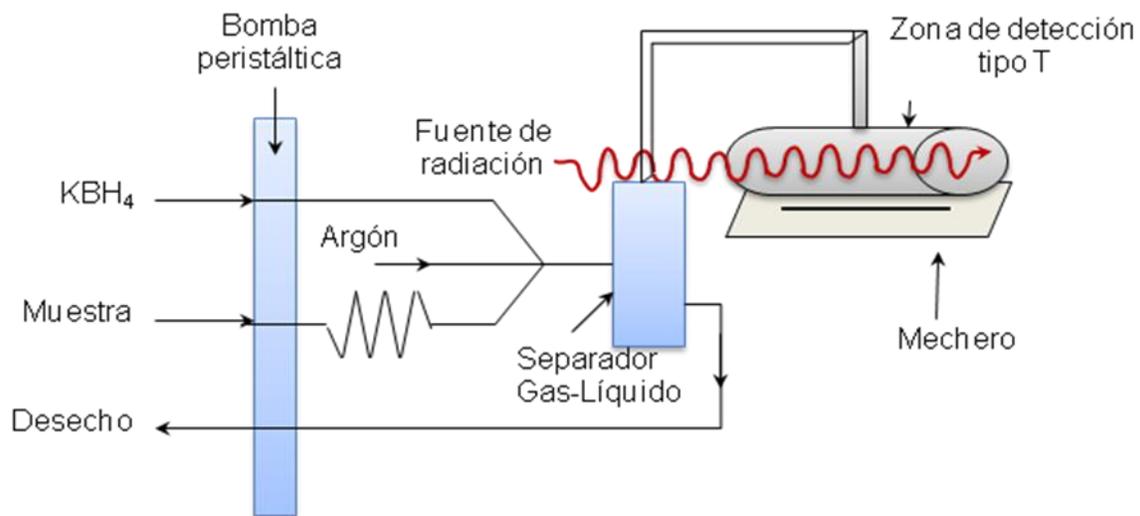


Figura 1: Diagrama de inyección en flujo continuo empleado para la generación de vapor frío de mercurio, en el cual se muestra que el mechero es utilizado únicamente como soporte para la T de vidrio o cuarzo, es decir, que durante el desarrollo de la metodología la llama se mantiene apagada.

Mecanismo para la generación del vapor frío de mercurio

Como se mencionó anteriormente, la técnica CV-AAS ha sido ampliamente utilizada en el caso del mercurio, en ésta el agente reductor (borohidruro de sodio (NaBH_4)) libera hidrógeno cuando entra en contacto con una solución ácida. Los mecanismos de reacción involucrados en la reducción de los iones metálicos son complicados y con frecuencia tienen lugar mediante la formación de intermediarios radicales. La siguiente ecuación representa el proceso de reducción de una manera simplificada ⁽³³⁾:

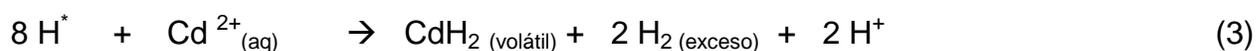


De acuerdo al tipo de matriz, la muestra requiere un tratamiento previo de manera tal que el mercurio se encuentre presente en su forma iónica en solución ácida. El reductor se pone en contacto con la solución de la muestra de tal manera que el mercurio sea reducido a su estado metálico. Debido a que el mercurio tiene una apreciable volatilidad a temperatura ambiente, el vapor metálico de dicho metal es expulsado de la solución de la muestra y transportado por el hidrógeno hasta la zona de detección generalmente una T de cuarzo, donde la absorción del elemento es detectada ⁽³²⁾.

Mecanismo para la formación del vapor frío de cadmio

El mecanismo para la formación del hidruro de cadmio o el vapor de dicho elemento, aún no se conoce con exactitud. En 1995 Sanz-Medel y colaboradores ⁽⁸⁾, propusieron

que los principales productos de la reducción parecían ser átomos libres y no el hidruro de cadmio (CdH_2), y que la subsiguiente interacción con el hidrógeno naciente produciría el hidruro molecular, dicho mecanismo lo describieron mediante las siguientes reacciones:



Donde: H^* = hidrógeno naciente

Sin embargo, investigaciones recientes muestran que la generación del hidrógeno naciente por la descomposición ácida del borohidruro de sodio no es factible ⁽³⁴⁾. Por consiguiente, hoy en día, el mecanismo de la formación de especies volátiles de cadmio tal como se describe arriba, no es aceptado, sin embargo se propone el siguiente mecanismo general para metales de transición ⁽³⁵⁾ tal como el cadmio:



Donde: L_3BH especies de hidroboro o sus productos de hidrólisis (L puede ser H).

L_nM = complejos del analito en solución acuosa.

1.4 Antecedentes de la generación de especies volátiles y vapor frío de cadmio

Cacho y colaboradores (1989) ⁽⁷⁾, fueron los primeros en reportar la determinación de Cd mediante VG-AAS. La generación de especies volátiles de cadmio fue llevada a cabo a través de la adición de borohidruro de sodio en un medio orgánico de N,N dimetilformamida (DMF) a una solución ácida de dietilditiocarbamato de cadmio (DDTC-CD) en DMF y su posterior determinación en un atomizador de tubo de cuarzo, calentado externamente con una llama.

Sanz-Medel y colaboradores (1995) ⁽⁸⁾, realizaron un trabajo en el cual mostraron que los átomos de cadmio podían ser formados a temperatura ambiente mediante el uso de vesículas, de aquí el desarrollo de un método muy sensible basado en la generación de vapor frío de cadmio y su detección mediante espectrometría de absorción atómica (CV-AAS) para la determinación de éste elemento. En la metodología desarrollada, llevaron a cabo la reducción del cadmio en solución de borohidruro de sodio en presencia de bromuro de didodecilmetilamonio (DDAB) utilizando un sistema de carga. Los resultados experimentales mostraron que la reducción del cadmio produce alguna especie de cadmio (probablemente el hidruro), a través de la cual el metal es transportado hasta la celda para su posterior detección. Concluyen que el uso de las vesículas para la generación de especies volátiles de cadmio, facilita el transporte del metal a la zona de detección, alcanzando un límite de detección de $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$. La metodología desarrollada pudo ser aplicada a muestras reales de líquenes e infusiones de té.

Por otro lado, los efectos negativos de numerosos iones metálicos interferentes (tales como Ag, Cu, Fe, Zn, Pb, Bi) en la generación de especies volátiles de cadmio ha sido estudiada exhaustivamente y se encuentra bien documentada ⁽²⁰⁾. Para mejorar los límites de detección de dicha técnica, se han propuestos muchos enfoques, que incluyen el uso de vesículas, agentes acomplejantes y algunos metales de transición, así como también preconcentración en trampas de atomización de vapor de Cd.

Guo and Guo (1995) ⁽⁹⁾, encontraron que el empleo de 1,0 % m/v de tiourea y 1,0 mg L⁻¹ de cobalto (Co⁺²) mejora en gran medida la eficiencia de la generación del vapor de cadmio. Basados en ello, investigaron el efecto de los metales del grupo VIII en la generación del vapor de cadmio. Sus resultados mostraron que los iones de cobalto y níquel en la presencia de una cantidad apropiada de 1,-10 fenantrolina, mejoraba la generación del vapor. En su trabajo, lograron llegar a un límite de detección de 20 ng L⁻¹, para el cual verificaron la exactitud aplicando la metodología a la determinación de cadmio en varios estándares y materiales de referencia certificados.

Vargas-Razo and Tyson (2000) ⁽³⁶⁾, mostraron que 10,0 µg L⁻¹ de Ni y 1,0 % m/v de tiourea reducen las interferencias de un gran número de iones metálicos. Por ejemplo la interferencia con respecto al plomo fue reducida de manera importante utilizando una técnica de coprecipitación con sulfato de bario (BaSO₄). Otro ejemplo de agentes acomplejantes lo constituye el cianuro de potasio (KCN) el cual ha mostrado ser bastante efectivo en la reducción de las interferencias de cobre durante la generación de especies volátiles de cadmio. Para la validación del trabajo desarrollado, emplearon dos muestras de referencia certificadas (suelo y hojas de manzana). Concluyeron que el método propuesto puede ser fácilmente aplicado a la determinación de cadmio en

suelos y muestras agrícolas, con excelentes resultados en términos de exactitud y precisión. El límite de detección reportado fue de 16 ng L^{-1} .

El posible papel de los agentes acomplejantes en esta reacción es prevenir la formación de aglomeraciones del analito y la precipitación eventual de éste. Mientras que la adición de metales de transición a la solución de reacción ha sido justificada como productora de un efecto catalítico durante el proceso de hidrogenación para acelerar la generación del vapor ⁽²⁰⁾.

Continuando en el estudio de las interferencias en los sistemas de generación de especies volátiles de cadmio, McLaughlin R., and Brindle I., (2002) ⁽³⁷⁾, en respuesta a muchos de los problemas asociados con la técnica de generación de vapor, describieron el sistema de introducción de muestra multimodal (MSISTM) diseñado para ICP-MS que permite una reacción homogénea entre el borohidruro de sodio con la muestra acidificada sobre la superficie de un fondo cónico de vidrio, donde rápidamente se remueven las especies volátiles de la solución. Este novedoso diseño, combina las capacidades tanto de la nebulización neumática como de la generación de vapor, de manera tal que provee bajos límites de detección para un gran número de elementos que forman especies volátiles.

Ritschdorff E., y colaboradores (2005) ⁽²⁰⁾, describieron un sistema multimodal modificado de introducción de muestra para la rápida y simple determinación de cadmio mediante la generación de vapor y su detección por espectrometría de absorción atómica. Mientras mantenga un volumen bajo, dicho sistema permitió el uso de concentraciones relativamente elevadas de los reactivos requeridos para la producción

eficiente de la especie volátil de cadmio sin burbujeo significativo, espuma y/o problemas comunes de transporte de líquido asociados a los separadores gas- líquido convencionales. Obtuvieron que la adición de cobalto, níquel y tiourea disminuyen las interferencias obteniendo un límite de detección de $0,026 \text{ ng L}^{-1}$, una precisión de 2,5 % para un estándar de $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ y un intervalo dinámico lineal aproximadamente hasta los $10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Además obtuvieron muy buena concordancia entre los valores experimentales y los valores certificados de materiales referenciales de agua natural y tejido de mejillón.

Manzoori J., y colaboradores (2007) ⁽²⁵⁾, realizaron la determinación de cadmio mediante CV-AAS después de realizar la preconcentración del mismo utilizando una metodología de extracción simplificada denominada “cloud point extraction” (CPE). Dicha metodología se basó en el CPE del cadmio a pH 8 usando un surfactante no iónico sin la adición de agente quelante. La generación del vapor fue realizada utilizando borohidruro de sodio al 3 % y ácido clorhídrico 0,2 mol/L como solución de arrastre. La gráfica de calibración usando este sistema de preconcentración fue lineal en un intervalo de 4-100 ng L^{-1} . El límite de detección obtenido en las condiciones óptimas fue de $0,56 \text{ ng L}^{-1}$. La aplicación de este método fue realizada en muestras de agua.

1.5 Instrumentación empleada en la generación de especies volátiles

En cuanto a la instrumentación utilizada para la generación de especies volátiles de cadmio y otros metales, podemos encontrar desde equipos comerciales, hasta celdas de reacción fabricadas en vidrio y/o cuarzo, diseñadas en diferentes laboratorios de

investigación. Según la IUPAC (1992) ⁽²⁴⁾, el montaje para la generación de vapor, incluyendo el manejo para controlar el flujo de gas de arrastre y el medio para la adición de reactivos usados para la producción de especies volátiles es conocido como generador de hidruros, generador de vapor de mercurio, u otros generadores. La mayoría de estos equipos comerciales están conformados fundamentalmente por bombas peristálticas, separadores gas- líquido y celdas de atomización tipo T (zona de detección). Entre otros, vale destacar que la zona de detección es conocida entre muchos autores como celda de atomización, sin embargo, en el presente trabajo se prefiere denominar la misma como zona de detección, ya que la celda de reacción es el conjunto general para formar la especie volátil, es decir, el reservorio, el separador gas- líquido y la zona de detección tipo T. Ésta última es colocada sobre el mechero para su posterior calentamiento en el caso de especies volátiles, mientras que para los casos de mercurio y cadmio, no se requiere de este último paso.

En cuanto a las celdas de reacción diseñadas para la generación de especies volátiles, ya sea de cadmio u otro metal, se pueden mencionar los siguientes trabajos:

Sanz-Medel y colaboradores (1995) ⁽⁸⁾, emplearon una celda de reacción diseñada y construida en su laboratorio, para la generación de vapor frío de cadmio. Esta celda de reacción consiste en un balón de destilación de tres bocas y/o entradas, provisto de un termostato. Una de las entradas fue empleada para conectar la celda a la zona de detección. Mediante la segunda entrada, se permitió el paso del flujo de argón, el cual se empleó como gas arrastre, y la última entrada fue cerrada mediante un septum, para permitir la adición del agente reductor con una jeringa. Este diseño de celda de reacción se puede apreciar en detalle en la Figura 2.

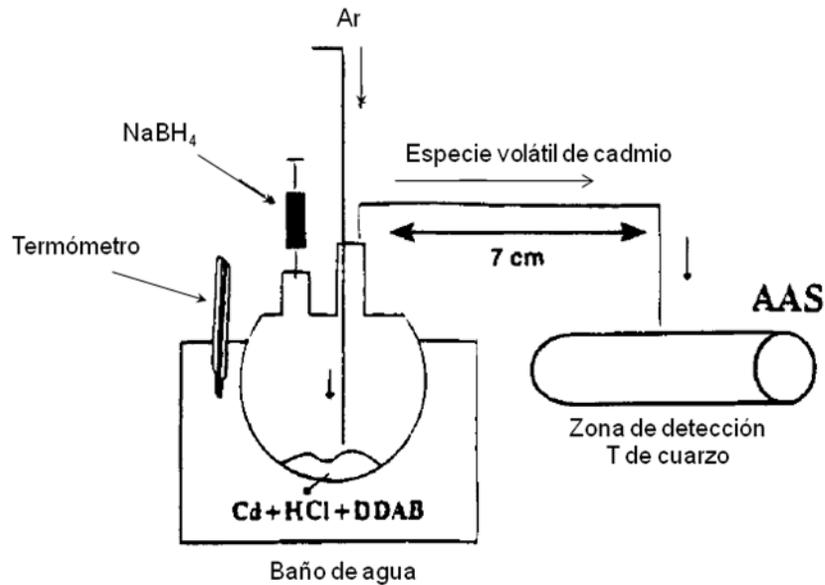


Figura 2: Celda de Reacción empleada por Sanz Medel y colaboradores para generar la especie volátil de cadmio⁽⁸⁾.

Maleki N., y colaboradores (1999)⁽³⁸⁾, realizaron la determinación de plomo mediante generación de hidruros mediante espectrometría de absorción atómica, utilizando un medio sólido para la generación del hidruro. El hidruro fue generado en un tubo calentado externamente con un bloque de aluminio, envuelto con un alambre de níquel cromo y transferido a la celda de cuarzo a través de una T en teflón y conexiones de vidrio, empleando como separador gas líquido lana de vidrio. Este diseño de celda de reacción se puede apreciar en la Figura 3. Entre sus resultados, se menciona la obtención de una ganancia en la reproducibilidad al adicionar cantidades elevadas de borohidruro de sodio. En su trabajo alcanzaron un límite de detección de $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$.

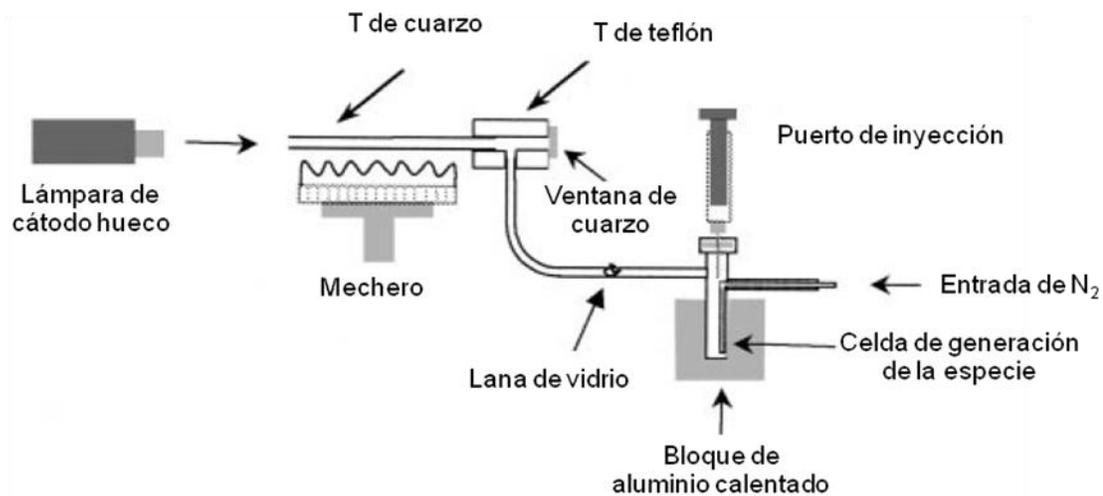


Figura 3: Diseño de celda de reacción empleado por Maleki y colaboradores para llevar a cabo la generación de la especie volátil de plomo ⁽³⁸⁾.

Murillo L., (2006) ⁽³¹⁾, diseñaron 2 celdas de reacción en material de vidrio para la generación de vapor frío de mercurio, (ver pagina 11, inyección por carga). Uno de estos modelos tiene incorporado en su geometría un separador gas-líquido, tal como se muestra en la Figura 4.

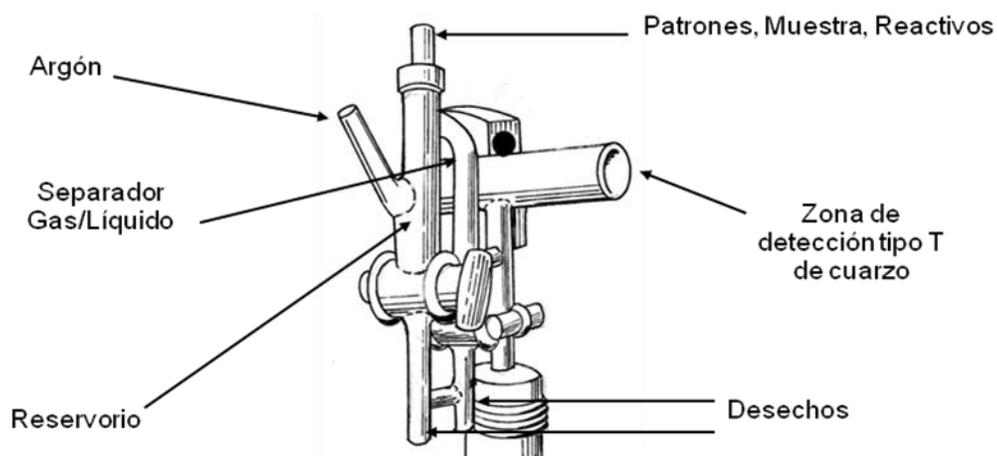


Figura 4: Celda de reacción empleada por Murillo L, para la generación de CV- Hg ⁽³¹⁾.

La técnica CV-AAS para el caso específico de cadmio está aún en desarrollo. Ésta requiere de diversas mejoras en la instrumentación y utilización de reactivos, que permitan alcanzar límites de detección cada vez más bajos y que a su vez se pueda aplicar para la determinación de éste elemento en muestras biológicas, debido a la toxicidad que representa para la salud humana.

En el presente trabajo se pretende realizar las modificaciones pertinentes a la celda de reacción empleada por Murillo L. ⁽³¹⁾, para adaptar la misma a un equipo marca GBC modelo AVANTA con corrección de fondo mediante lámpara de Deuterio y evaluar el funcionamiento de la celda de reacción en cuanto al volumen empleado, tanto de reactivos como de muestra y las diferentes figuras de mérito , entre otros parámetros para validar la metodología, para la generación de vapor frío de cadmio en muestras de orina y llevar a cabo su determinación mediante espectrometría de absorción atómica (CV-AAS).

OBJETIVOS

GENERAL

- ❖ Evaluar una celda de reacción diseñada en el Laboratorio de Espectroscopia Atómica de la USB, en cuanto a su funcionamiento para la generación de vapor frío de cadmio.

ESPECIFICOS

- ❖ Optimizar los parámetros que intervienen en la generación del vapor frío de cadmio, tales como: las concentraciones del agente reductor, ácido, cobalto, tiourea y el flujo de argón.
- ❖ Determinar las figuras de mérito del método.
- ❖ Aplicar la metodología desarrollada en muestras de orina, y validarla mediante la determinación de las figuras de mérito asociadas a la sensibilidad (LD), exactitud (prueba t) y precisión (% RSD).

PARTE EXPERIMENTAL

1. Instrumentación

- ❖ Las medidas de absorbancia fueron realizadas empleando un Espectrofotómetro de Absorción Atómica con llama, marca GBC modelo AVANTA, a una longitud de onda de 228,8 nm. El equipo consta de un sistema óptico de doble haz y corrección de fondo mediante lámpara de deuterio, se le acopló una celda de reacción para la generación del vapor frío de cadmio.
- ❖ La celda de reacción empleada está constituida por un reservorio, un separador gas-líquido y la zona de detección tipo T, todo en vidrio, fabricada en el taller de soplado de vidrio de la USB (ver Figura 5), cuyo reservorio tiene una capacidad de, aproximadamente, 2,5 mL y la zona de detección una longitud de 13,0 cm con un diámetro 1,5 cm. Un modelo similar a éste fue empleado previamente por Murillo L.⁽³¹⁾, para la determinación de mercurio mediante CV-AAS.

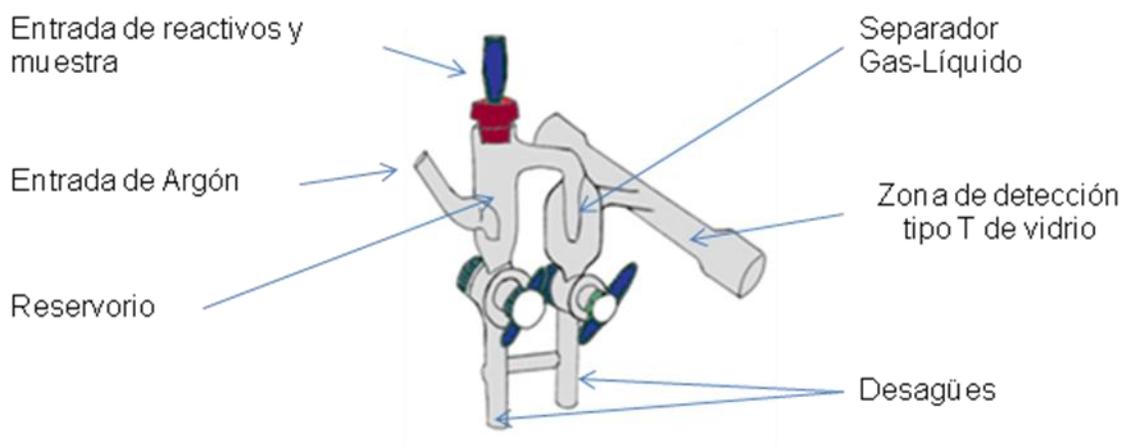


Figura 5: Celda de reacción y sus partes.

- ❖ Horno de microondas doméstico modificado, modelo EM-M070, marca Sanyo (Figura 6).

El horno de microondas empleado para la digestión de las muestras de orina, ha sido ampliamente utilizado en el Laboratorio de Espectroscopía Atómica de la USB con fines analíticos ^(39,40). Éste horno de microondas fue diseñado para el uso doméstico, sin embargo, con las modificaciones pertinentes, se demostró que ofrece resultados satisfactorios para la disolución de las muestras de origen biológico, tales como orina y sangre ⁽³⁹⁾.



Figura 6: Horno de microondas modificado.

- ❖ Balanza analítica, modelo METTLER AJ180 de precisión $\pm 0,0001$ g.
- ❖ Celda de reacción para la generación del vapor frío de Cd.

2 Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

- ❖ Solución estándar de Cd 1000 mg L⁻¹, preparada a partir de una ampolla Titrisol®.
- ❖ Agente Reductor: Borohidruro de sodio p.a. Riedel de Haën; hidróxido de sodio EKA Nobel purísimo 98 % p/p.
- ❖ Solución estándar de cobalto de 1000 mg L⁻¹ Arro Laboratories Inc.
- ❖ Acido Clorhídrico p.a. (HCl 37 % p/v) Riedel de Haën.
- ❖ Tiourea p.a. (99 % p/p) Riedel de Haën.
- ❖ Acido Nítrico p.a. (HNO₃ 65 % p/v) Riedel de Haën.
- ❖ Peróxido de hidrogeno (H₂O₂ 30 % v/v) MERCK.
- ❖ Agua des-ionizada 18 MΩ.

3 Procedimiento Experimental

❖ Lavado del material

Todo el material volumétrico empleado fue lavado con jabón líquido diluido y enjuagado varias veces con agua destilada. Este material fue dejado aproximadamente 12 horas en ácido nítrico al 10 % y luego enjuagado con agua des-ionizada.

❖ Optimización de los parámetros experimentales

La optimización de los parámetros se realizó de manera univariada y multivariada. Los reactivos HCl, Co y tiourea se introdujeron al sistema mezclados previamente, a las concentraciones particulares de cada experiencia. La mezcla de estas soluciones facilita su introducción en el sistema. Esta solución se denominara como mezcla de soluciones.

Modo Univariado

Se optimizaron los parámetros siguientes y en el orden descrito.

1. Concentración del HCl.
2. Concentración de la tiourea.
3. Concentración de Co.
4. Concentración del NaBH_4 .

En la Tabla 2 se muestran los intervalos de concentración considerados en la optimización univariada.

Tabla 2: Parámetros optimizados en la generación del vapor frío de cadmio.

REACTIVO	INTERVALO DE CONCENTRACIONES
HCl	0 – 0,3 mol/L
NaBH ₄	1,0 – 6,0 % m/v
Co	1,0 – 10,0 mg L ⁻¹
Tiourea	0 – 5,0 % m/v

Modo Multivariado

Se aplicó un diseño Box Behken de cuatro factores y dos niveles para optimizar los parámetros de concentración del HCl, Co, tiourea y NaBH₄. En la Tabla 3, se muestran los factores y niveles considerados en el diseño. La data fue evaluada en el programa Statgraphic Plus 5.1 para Windows. La variable de respuesta fue la variable absorbancia (Abs) bajo el modo de medición Running mean.

Tabla 3: Niveles y factores del diseño Box-Behken para analizar los efectos de los parámetros ácido clorhídrico, cobalto, tiourea y borohidruro de sodio en la señal del vapor frío de cadmio.

Factor	Variables	Nivel Bajo (-1)	Punto Central (0)	Nivel Alto (+1)
A	HCl mol/L	1,50	2,75	4,00
B	Co mg L ⁻¹	1,00	2,25	3,50
C	Tiourea % m/v	2,00	4,00	6,00
D	NaBH ₄ % m/v	4,00	5,50	7,00

❖ Tratamiento de las muestras

Las muestras de orina fueron digeridas en medio ácido asistido con horno de microondas. Para ello se tomaron 5,0 mL de orina en los tubos de vidrio esmerilados marca Pyrex, y 1,0 mL de ácido clorhídrico concentrado. Las muestras fueron calentadas en el horno de microondas a una potencia del 65 % durante 5 min. El procedimiento planteado en un principio, descrito por Alizo D. y colaboradores ⁽³⁹⁾, el cual consistía en adicionar a 1,0 mL de la muestra, 3,0 mL de HNO₃ concentrado y 1,0 mL de H₂O₂, no fue llevado a cabo ya que se encontró reportado en la literatura ⁽⁴²⁾, que el ácido nítrico suprime la señal del cadmio debido a su carácter oxidante al igual que el peróxido de hidrógeno.

❖ Evaluación de la celda de reacción.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la generación del vapor frío de cadmio, se procedió a evaluar la celda de reacción en base a las figuras de mérito:

1. Sensibilidad
2. Limite de detección.
3. Exactitud.
4. Reproducibilidad.
5. Porcentaje de recuperación.

❖ Lugar de trabajo

Tanto los equipos empleados como los reactivos estuvieron a disposición en el Laboratorio de Espectroscopia Atómica del Departamento de Química de la Universidad Simón Bolívar, exceptuando el agente antiespumante empleado para las muestras de orina y la muestra control Lyphochek marca Bio-rad Nivel 1, los cuales fueron suministrados por la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

Antes de entrar en detalle en lo que respecta a la optimización de las variables químicas que intervienen en la generación del vapor frío de cadmio y la validación de la metodología propuesta, se discutirá lo correspondiente a los parámetros físicos del diseño de la celda de reacción, el manejo del software del equipo, y la optimización del ensamblaje para la introducción de la muestra y los reactivos.

Estudios preliminares realizados con la celda demostraron que debido a la capacidad de la misma, los volúmenes de reactivos no debían sobrepasar un volumen total de 500 μL . por ello se limitaron los volúmenes de “mezcla de soluciones” a 100 μL , agente reductor 100 μL y muestra o solución patrón a 300 μL .

En un principio, se había propuesto utilizar una celda de reacción como la que se muestra en la Figura 7.a. Como se puede apreciar esta celda tiene un diseño compacto o en una sola pieza, que permite trabajar con el espectrofotómetro de absorción atómica sin remover piezas del mismo, tales como el nebulizador. Sin embargo, cuando se comenzó a usar, la señal analítica no fue detectada, empleando las condiciones señaladas en la Tabla 4. Se presumió que el diseño de la celda no era el apropiado, ya que el camino por el cual el analito es transportado desde el separador gas-líquido hasta la zona de detección era muy largo y la geometría dispuesta era vertical en vez de horizontal, como ya se ha reportado ³¹, por lo que se procedió a modificar el diseño de la celda.

La modificación realizada consistió en acortar el camino de transporte, de aproximadamente 16 cm en posición vertical, por otro de sólo 6 cm en posición horizontal, colocado desde la salida del separador gas –líquido, tal como se puede apreciar en la Figura 7.b.

Tabla 4: Condiciones iniciales de trabajo tanto químicas, como físicas para la generación del vapor frío de cadmio.

		Parámetro	Valor
Físicas	Longitud de onda		228,8 nm
	Modo de medición		Integración (3 réplicas)
	Tiempo de lectura		3 seg
Químicas	HCl		0,1 mol L ⁻¹
	Tiourea		1,0 % m/v
	Co		2 mg L ⁻¹
	NaBH ₄		4 % m/v

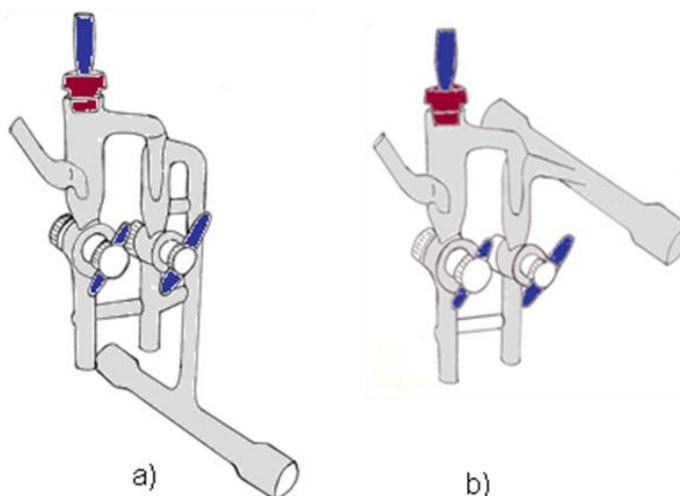


Figura 7: Modelos de celdas de reacción: a) modelo propuesto originalmente, b) modelo rediseñado para acortar el camino de transporte de la especie volátil.

Una vez modificada la celda de reacción se comenzó a trabajar bajo las condiciones citadas en la Tabla 3. Nuevamente, la señal no fue detectable e inclusive negativa en algunos casos. Por ello se tomó la decisión de variar las concentraciones de los reactivos, comenzando con la del ácido, ya que según la literatura revisada, la acidez del medio es determinante en la generación de la especie volátil de cadmio. Optimizando esta variable de manera univariada, se encontró un incremento en la respuesta de la señal del analito, pero sin embargo, la misma disminuía con el tiempo, tal como se puede apreciar en la Figura 8. Hay que destacar, que estas condiciones no fueron empleadas para el primer modelo de celda, ya que en primer lugar se presumió que no se obtenía señal debido a que dicho diseño no era el apropiado por las razones ya mencionadas.

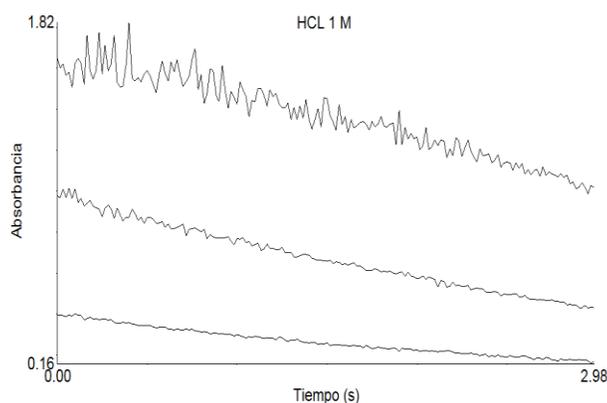


Figura 8: Señales obtenidas para la especie volátil de cadmio generada a partir de las condiciones citadas en la Tabla 3. Concentración del ácido $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Posteriormente, se optimizó de manera univariada las siguientes condiciones: concentración del agente reductor, flujo de argón y los diversos tiempos de lectura en el modo integración. Variando este último parámetro se presumió que la especie tenía un tiempo de vida corto, ya que cuando el tiempo de lectura era de 0,5 segundos se mejoraba la reproducibilidad.

Se detectó que parte de la irreproducibilidad de las señales era debida a falta de estabilidad del acoplamiento de la celda al espectrómetro. Para subsanar este problema se empleó una base metálica que permitió mantener fija la celda en relación al camino óptico. El arreglo se muestra en la Figura 9.

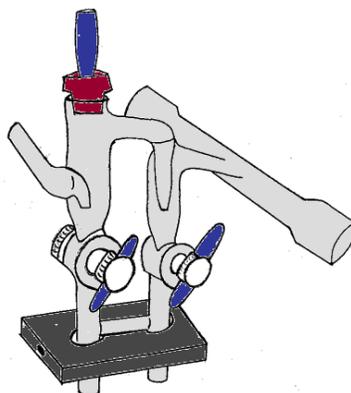


Figura 9: Celda de reacción sujeta a una pieza metálica para proporcionarle estabilidad.

Dado que el software del equipo consta del panel de lecturas continuas, se procedió a emplear el mismo para monitorear las señales del analito y se logró observar la formación de picos, los cuales desaparecían rápidamente. Lográndose obtener gráficas de los picos correspondientes a la señal de absorbancia de la especie volátil mediante el empleo del computador, usando el modo "print screen". Dichas figuras se muestran en la Figura 10.

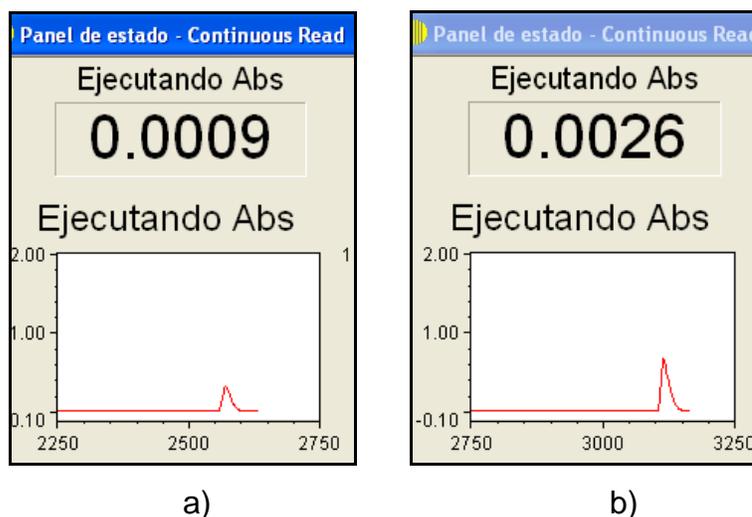


Figura 10: Señales obtenidas para la especie volátil de cadmio a diferentes concentraciones, empleando el panel de lecturas continuas: a) Solución patrón de cadmio $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$; b) Solución patrón de cadmio $8,0 \mu\text{g g}^{-1}$.

El software del equipo permite varios modos de medición, estos son: Running mean, integración, área máxima y altura máxima. Mediante el modo de medición Running mean, se puede monitorear la aparición y desaparición de los picos y a su vez cuantificar los mismos.

Se comenzó a trabajar empleando el modo de cuantificación Running mean, teniendo en cuenta que el tiempo de vida de la especie era de aproximadamente 3 segundos. Observándose también que la intensidad y la irreproducibilidad de la señal estaban afectadas por la inyección de los reactivos, siendo la inyección del agente reductor la que ejercía el mayor efecto en la señal analítica.

El orden de inyección fue el siguiente: inyección de la solución patrón de cadmio y la Mezcla de soluciones de Co más tiourea más HCl por la parte superior del reservorio y del agente reductor por una entrada lateral que posee la celda.

Debido a la elevada velocidad de formación de la especie volátil, fue necesario iniciar la lectura antes de añadir el reductor para captar la señal correspondiente, de otra forma sólo se obtenía la parte correspondiente al decaimiento de la señal, como se puede apreciar en la Figura 11.a. La Figura 11.b representa la señal en su totalidad.

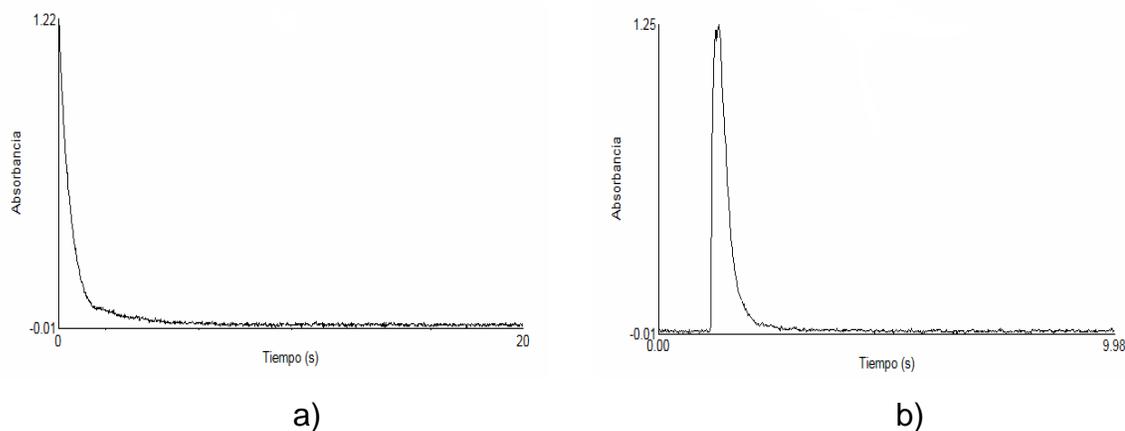


Figura 11. Señal obtenida para una solución patrón de cadmio de $80 \mu\text{g g}^{-1}$, empleando el modo de medición Running mean.

En base a estas observaciones se comenzó a trabajar bajo las condiciones de la Tabla 5.

Tabla 5: Nuevas condiciones de trabajo para generar la especie volátil de cadmio.

	Parámetro	Valor
Físicas	Longitud de onda	228,8 nm
	Modo de medición	Running mean
	Tiempo de lectura	5 seg
Químicas	HCl	$0,1 \text{ mol L}^{-1}$
	Tiourea	1,0 % m/v
	Cobalto	2 mg L^{-1}
	NaBH_4	4 % m/v

Ensayos posteriores realizados en el laboratorio, indicaron la necesidad de una modificación de la celda bajo estudio en ese momento. Ésta nueva modificación consistió en aumentar la capacidad del separador gas- líquido hasta aproximadamente 2,5 mL, para incrementar su eficiencia en cuanto al control de la espuma, factor que resulta determinante cuando se trabaja con muestras de sangre u orina, en cuyos casos se procede a emplear agentes antiespumantes y separadores gas-líquido más eficientes, ya que si alguna gota de la solución llega hasta la zona de detección, la lectura es errónea (ver Figura 12).

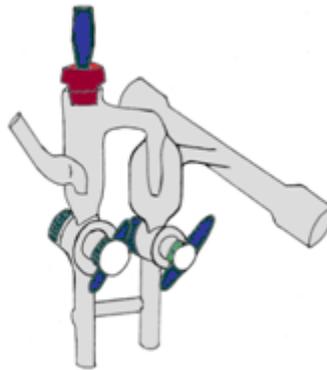


Figura 12: Celda de reacción reconstruida con separador gas-líquido de mayor capacidad (aproximadamente 2,5 mL).

Una vez reconstruida la celda de reacción, aún persistía un problema por resolver correspondiente a la inyección del agente reductor. Inyecciones bruscas del agente reductor implicaban formación violenta de burbujas conduciendo esto a irreproducibilidad de la señal, ya que estas burbujas al alcanzar la zona de detección causan falsas medidas de absorción. La opción de deslizar la solución del reductor por las paredes del reservorio eliminó el problema de la inyección violenta pero produjo señales mucho menores. Para tratar que la reacción fuera menos violenta, fueron probados desde septum de inyección, hasta mangueras de teflón de aproximadamente 1 mm de diámetro interno y de diferentes longitudes (ver Figura 13), para que la

solución del reductor entrara en contacto lentamente con el estándar o muestra y la Mezcla de soluciones de Co más tiourea más HCl en el seno de éstos y minimizar así la formación de burbujas.

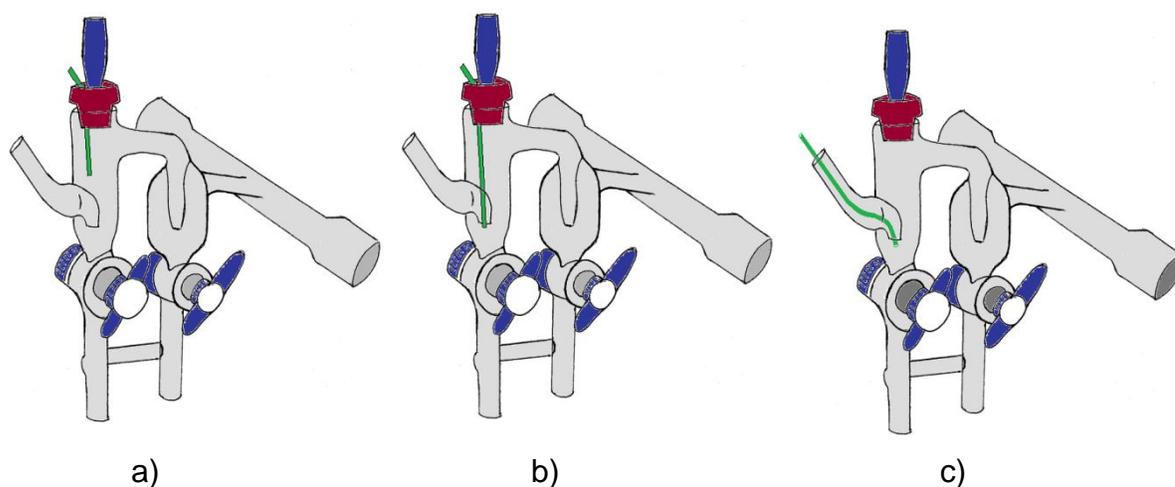


Figura 13: Celdas de reacción con mangueras incorporadas para mejorar la inyección del agente reductor.

13.a y 13.b: con mangueras corta y larga respectivamente, incorporadas por la parte interna del reservorio; 13.c con la manguera colocada por el canal de entrada del argón.

Se determinó que al colocar las mangueras por la parte interna del reservorio se daba lugar a la condensación de la especie volátil en la pared externa de éstas y además obstruían la salida de la especie volátil hacia el separador gas líquido, por lo que esta se introdujo por el canal de entrada de argón (figura 13.c). Introduciendo la manguera de esta forma, se logró controlar la inyección del agente reductor para que no se formaran burbujas y se evitó la condensación del analito. Este arreglo permitió la obtención de las mejores señales analíticas en cuanto a sensibilidad y reproducibilidad.

2 Optimización Univariada

Para llevar a cabo la optimización univariada de las concentraciones de los cuatro factores involucrados en la generación de la especie volátil de cadmio, ácido, cobalto, tiourea y agente reductor, se procedió a evaluar el ácido, en primer lugar, ya que la acidez del medio juega un papel determinante en la generación del vapor frío de cadmio.

La Figura 14 muestra la variación de la señal de absorbancia del analito con la concentración del ácido. La señal máxima fue obtenida para concentraciones de HCl entre 2,8 a 3,0 mol L⁻¹. Para eliminar dudas entre cual valor de concentración de HCl era el adecuado se aplicó una *prueba t* para determinar si había diferencias significativas entre las concentraciones, la cual arrojó que no había diferencias significativas entre los valores antes citados a un 95 % de confianza. Por ello se decidió emplear el volumen equivalente a una concentración de 2,8 mol L⁻¹. En las siguientes experiencias, la acidez del medio fue mantenida fija a una concentración 2,8 mol L⁻¹ de ácido. Vale destacar que sin la presencia de ácido en el medio, no se da la formación de la especie volátil de cadmio.

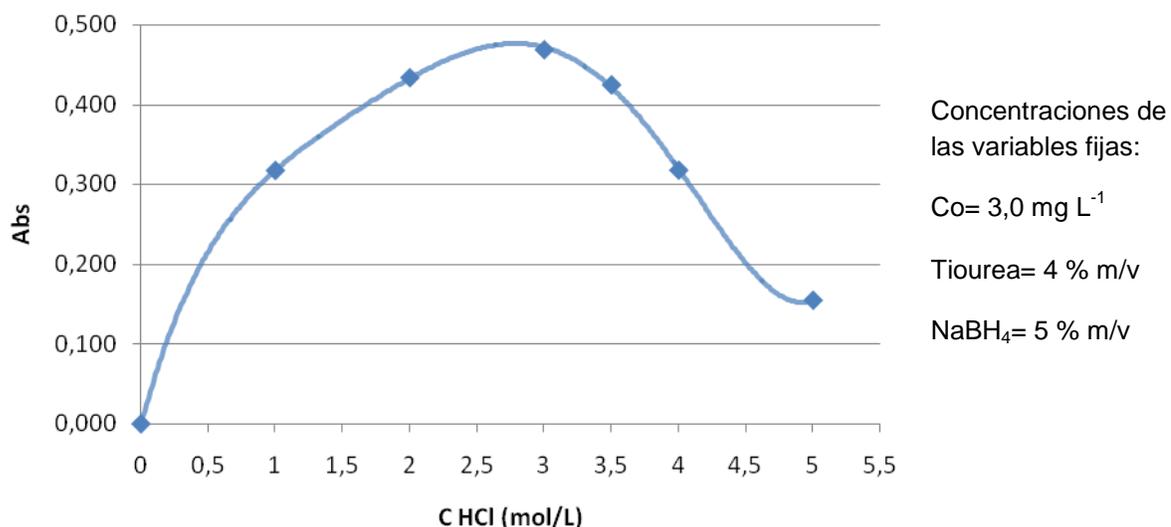


Figura 14: Optimización de la concentración de HCl en la mezcla de soluciones.

Como se puede ver, en la Figura 15, la formación del vapor frío de cadmio tiene lugar aún en ausencia de tiourea, aunque la señal sea menor. Sin embargo, cuando se incrementa la concentración de tiourea la señal analítica aumenta, hasta alcanzar un valor máximo y luego disminuye gradualmente con el aumento de la concentración de tiourea. Al igual que en el caso anterior se aplicó una *prueba t* para determinar posibles diferencias significativas entre el empleo de 4 % m/v y 5 % m/v de tiourea, no determinando diferencias significativas entre dichos valores, decidiéndose por el empleo a una concentración de tiourea igual a 4% m/v.

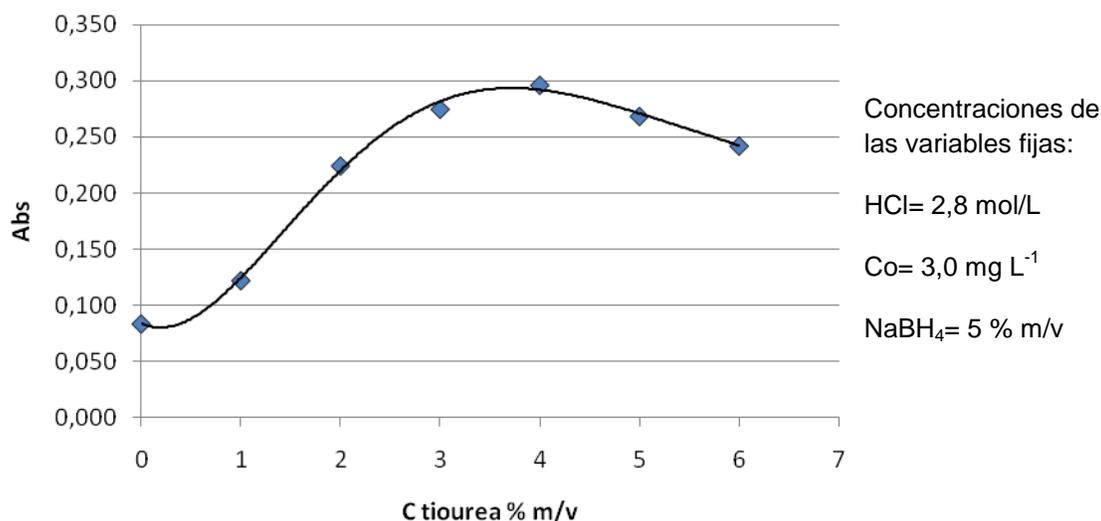


Figura 15: Optimización de la concentración de tiourea en la mezcla de soluciones.

En cuanto al efecto de la concentración del cobalto en la señal analítica, en la Figura 16 se muestra que, aún sin el cobalto presente en la Mezcla de soluciones, hay lectura de señal. La señal analítica se incrementa con el aumento de la concentración del cobalto en solución, hasta alcanzar un valor máximo, comprendido entre 2,0 y 3,0 mg L⁻¹, y posteriormente la señal analítica disminuye al seguir aumentando la concentración de este reactivo. Aplicando nuevamente un análisis de varianzas, se obtuvo que no hay una diferencia significativa en la señal analítica entre el empleo de concentración entre 2,0 y 3,0 mg L⁻¹ para un 95 % de confianza, por lo que se decidió por 2,0 mg L⁻¹ para continuar las experiencias y así evitar la precipitación del sulfuro de cobalto (precipitado de partículas finamente divididas de color negro) que ocurre a concentraciones elevadas de tiourea.

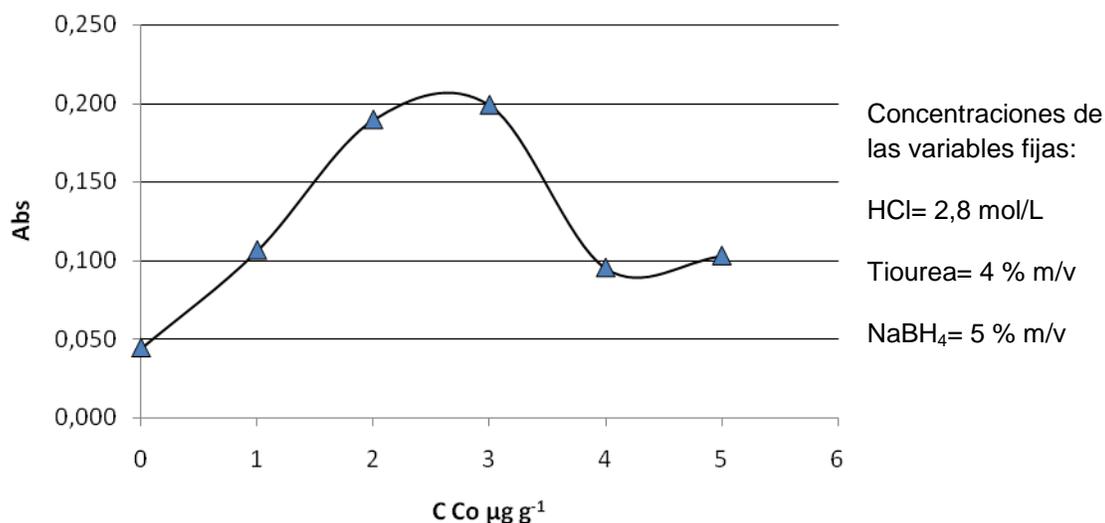


Figura 16: Optimización de la concentración de cobalto en la Mezcla de soluciones.

Con respecto al efecto del agente reductor en la generación del vapor frío de cadmio, se puede observar en la Figura 17 que la concentración mínima del reductor requerida para la generación de la especie es de 3,0 % m/v. La formación apreciable de la especie requiere elevadas concentraciones del reactivo (mayores al 4 % m/v). La señal analítica se mantuvo constante en el intervalo de concentraciones de 6 a 8 % m/v, sin embargo es recomendable no emplear elevadas concentraciones de éste, ya que la reacción resulta ser bastante violenta y pueden pasar burbujas y/o espuma hasta la zona de detección, por lo que se escogió como valor óptimo 7,0 % m/v de NaBH₄.

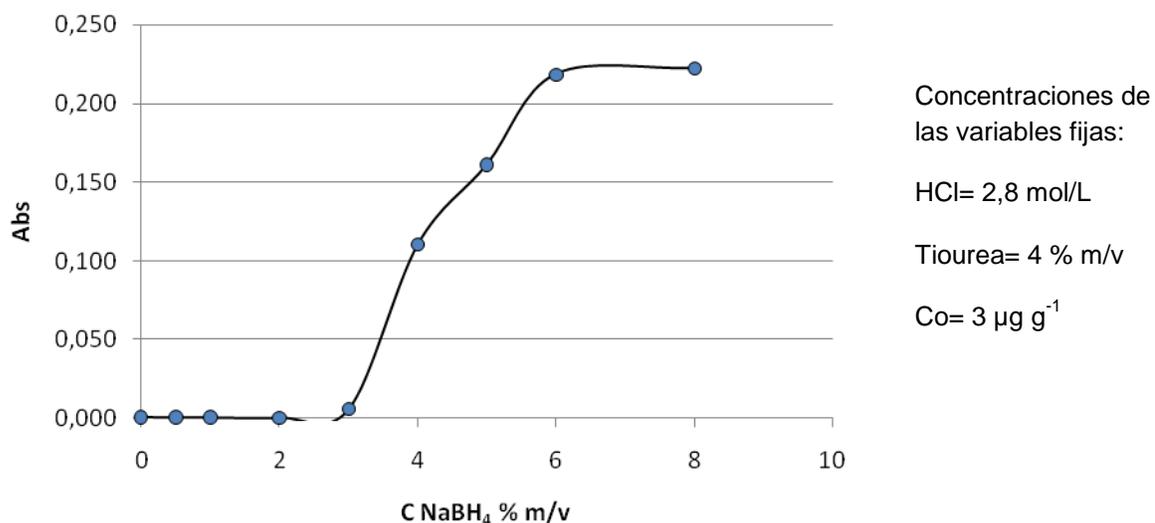


Figura 17: Optimización de la concentración del agente reductor.

Validación del método

Las condiciones optimizadas según el método univariado se señalan en la Tabla 6.

Tabla 6: Concentraciones óptimas de los reactivos utilizados obtenidas mediante el método univariado.

Variables	Univariado Patrones Acuosos
HCl	2,8 ± 0,03 mol L ⁻¹
Co	2,00 ± 0,008 mg L ⁻¹
Tiourea	4,00 ± 0,03 % m/v
NaBH ₄	7,00 ± 0,02 % m/v

Para la validación de la metodología optimizada se determinaron la sensibilidad, la precisión, el límite de detección y la exactitud. En primer lugar se realizó la curva de calibración con patrones acuosos. Puesto que se está generando un vapor frío, las interferencias matriciales deberían ser nulas. Además, se verificó que el intervalo de concentraciones utilizadas para la realización de la curva estuvieran en el intervalo lineal, a fin de cumplir con la Ley de Beer. La curva obtenida se muestra en la Figura 18.

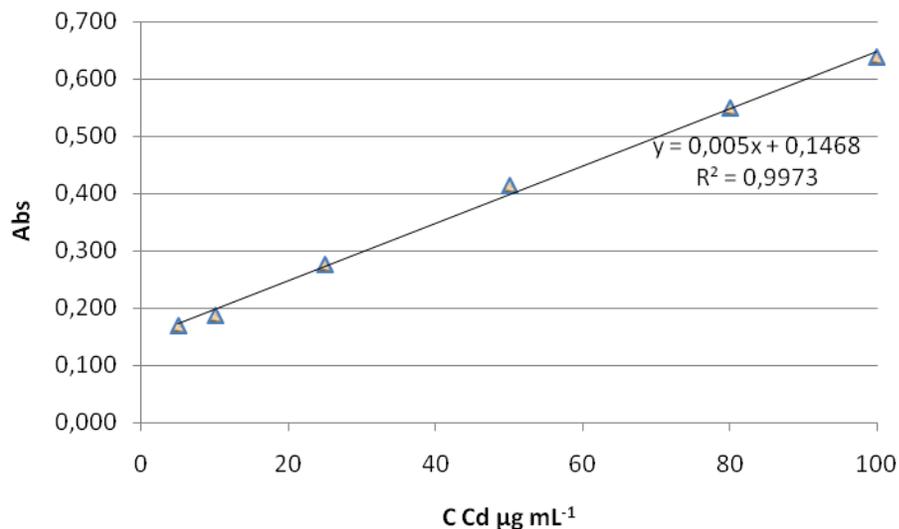


Figura 18: Curva de calibración para el cadmio bajo las condiciones optimizadas de manera univariada.

❖ Limite de Detección

El límite de detección fue calculado como tres veces la señal de la desviación estándar de un conjunto de 10 mediciones de un patrón de 5,00 µg L⁻¹, entre la pendiente. El valor obtenido para la metodología desarrollada fue de 0,96 µg L⁻¹.

❖ Exactitud de la metodología

En la Tabla 7 se muestran las concentraciones de cadmio determinadas en dos muestras de orina provenientes de donantes diferentes, así como también los porcentajes de recuperación correspondientes para cada una de ellas:

Tabla 7: Concentración de cadmio determinadas en muestras de orina mediante la optimización univariada de los parámetros.

Muestra	C_M ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C_{PA} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C_D ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% R	% R _{promedio} (CV)
1	$47,1 \pm 0,1$	30,00	73,26	95,01	94 (1)
1	$45,88 \pm 0,07$	30,00	71,04	93,62	
2	ND	40,00	36,22	90,55	92 (2)
2	ND	40,00	37,31	93,28	

M= muestra; PA= patrón agregado; D: determinada; R= recuperación

Ya que las muestras no son certificadas, se determinó el porcentaje de recuperación de la concentración de las muestras luego de su digestión, el cual fue satisfactorio.

3. Estudio del comportamiento de la señal analítica en función de dos modos de medición: Running mean Vs Integración

Una vez encontradas las condiciones óptimas para la generación de la especie volátil de cadmio y antes de realizar la optimización multivariada, se procedió a evaluar si el

modo de medición empleado Running Mean era el más adecuado para realizar las mediciones, esto debido a que la mayoría de los investigadores reportan la integración como modo de medición ^(referencias). Entonces, bajo las mismas condiciones tanto químicas como físicas fueron medidas las absorbancias de una serie de tres patrones. Primero, bajo el modo de medición Running Mean y luego bajo el modo de medición Integración. A continuación se muestran las curvas de calibración correspondientes para cada uno de ellos:

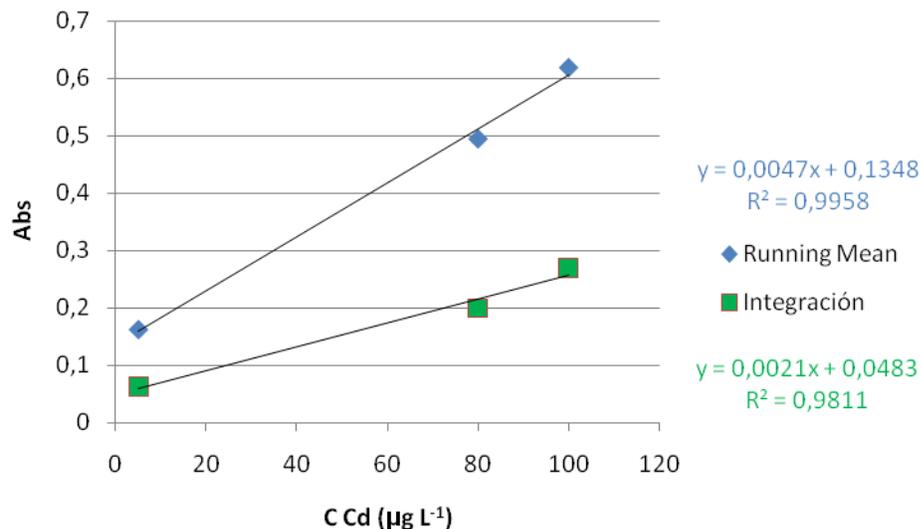


Figura 19: Curvas de calibración para cadmio obtenidas mediante dos modos de medición, Running mean e integración.

En la Figura 19 se aprecia que las curvas de calibración correspondientes a los dos modos de medición empleados proveen diferente sensibilidad, siendo el modo Running Mean el más sensible (doble de la sensibilidad obtenida mediante el modo de medición integración). Se presume que es debido a que el decaimiento de la señal es muy rápido y la integración aplicada no es suficiente (ver Figura 11).

4 Optimización multivariada

El diseño Box Behnken aplicado de cuatro factores y dos niveles, contemplo un total de 27 experiencias, cada una de las cuales fue realizada aleatoriamente y por duplicado, para dar un total de 54 experiencias. Cabe destacar que estas 54 experiencias fueron realizadas tanto para patrones acuosos como para la muestra, para determinar si había interferencias matriciales. En el Apéndice 1 se muestran las condiciones de la experiencia.

En la Figura 20 se muestran las gráficas de Pareto obtenidas para el 95% de confianza en el análisis del diseño multivariado Box Behnken aplicado a una muestra de orina dopada con $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de cadmio. Un efecto positivo (+) indica que al incrementar la magnitud del factor se produce un incremento en la señal de AAS, mientras que un efecto negativo (-) indica que al incrementar la magnitud de dicho factor la señal analítica disminuye.

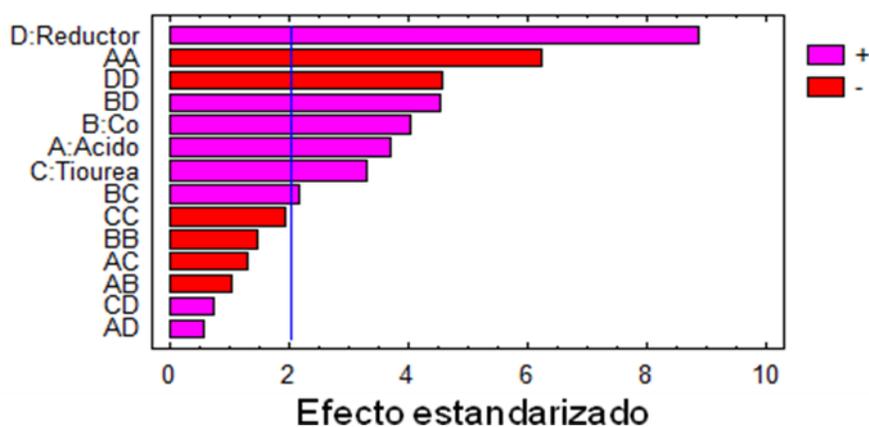


Figura 20: Gráfica de Pareto para estudiar los efectos de la concentración de los factores A, B, C, y D involucrados en la generación del vapor frío de cadmio empleando una muestra de orina contaminada con $40 \mu\text{g L}^{-1}$.

Como se puede apreciar en la Figura 20, cada uno de los factores estudiados (A,B,C,D) ejercen un efecto significativo y positivo en la señal analítica. Por otro lado, también se puede observar que los efectos combinados o de segundo orden (AA y DD) resultaron significativos pero negativos en la señal analítica, mientras que el BD resultó ser positivo. En el Apéndice 2 se muestran los valores determinados para los efectos y su valor P y F correspondiente.

Además de las gráficas de Pareto, también se obtuvieron las superficies de respuesta (Figura 21), de las cuales se obtienen los valores óptimos de cada reactivo para incrementar la señal del analito.

Los valores óptimos codificados obtenidos para cada una de las variables o factores estudiados, se muestran en la Tabla 8 junto con los valores decodificados de las concentraciones.

Tabla 8: Valores óptimos determinados con el diseño Box Behnken

Variables	Valores Codificados		Valores Decodificados	
	Patrones Acuosa	Muestra	Patrones Acuosa	Muestra
HCl	1,00	0,02	4,00 mol L ⁻¹	2,78 mol L ⁻¹
Co	1,00	1,00	3,50 mg L ⁻¹	3,50 mg L ⁻¹
Tiourea	0,64	0,95	5,27 % m/v	5,90 % m/v
NaBH ₄	1,00	1,00	7,00 % m/v	7,00 % m/v

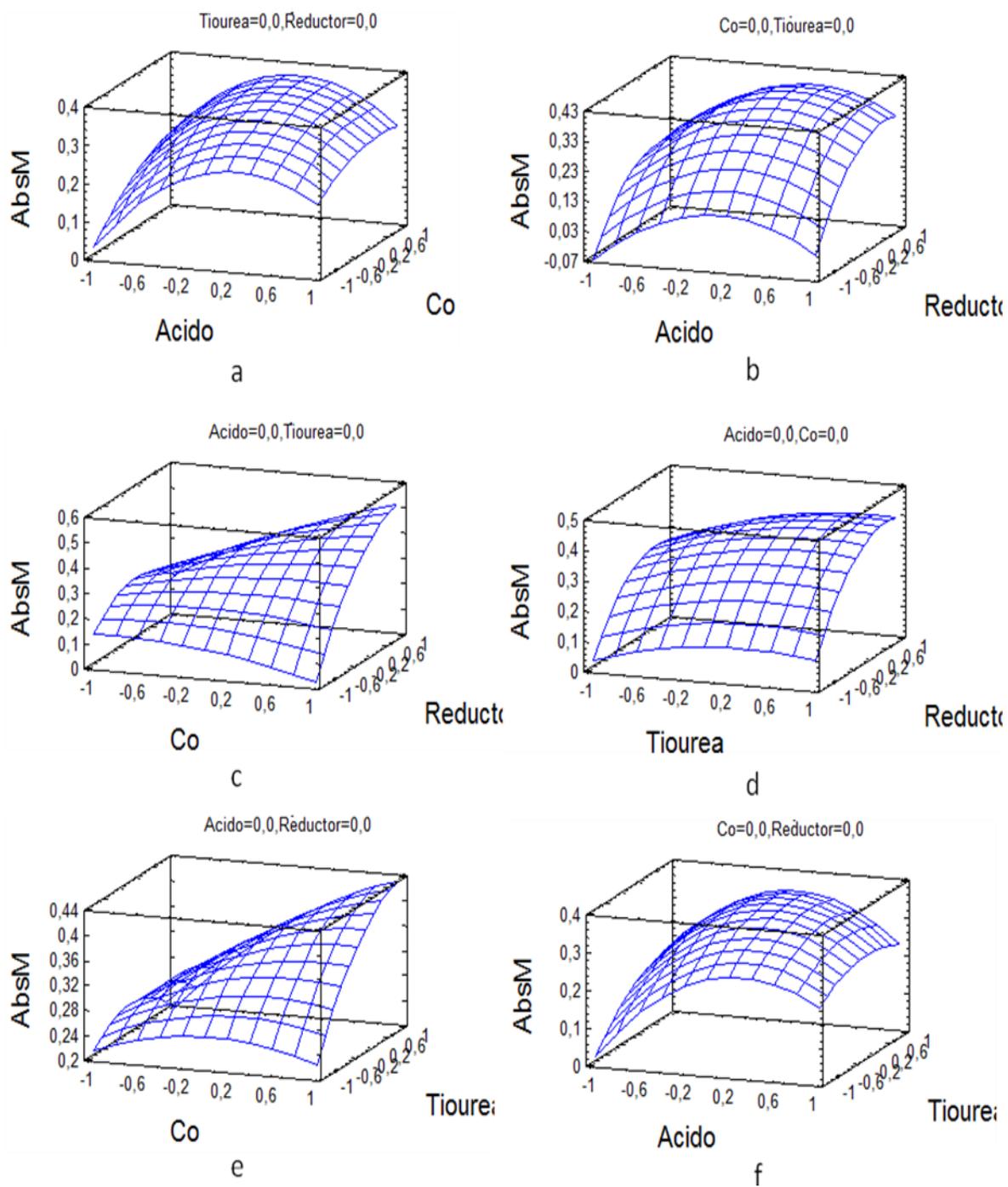


Figura 21: Superficies de respuesta obtenidas en la muestra de orina contaminada (la concentración de las lecturas se muestra en valores codificados).

Para convertir los niveles factoriales originales en sus valores codificados correspondientes y viceversa, se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$M = (\text{alto} + \text{bajo}) / 2$$

$$H = (\text{alto} - \text{bajo}) / 2$$

$$X_i^* = (X_i - M) / H$$

$$X_i = X_i^* \times H + M$$

Donde; alto y bajo se refieren a los valores máximo y mínimo del intervalo en su nivel no codificado, X_i factor original sin codificar y X_i^* corresponde al factor codificado ⁽⁴³⁾.

En la Figura 22 se muestra la curva de calibración obtenida bajo las condiciones optimizadas de manera multivariada.

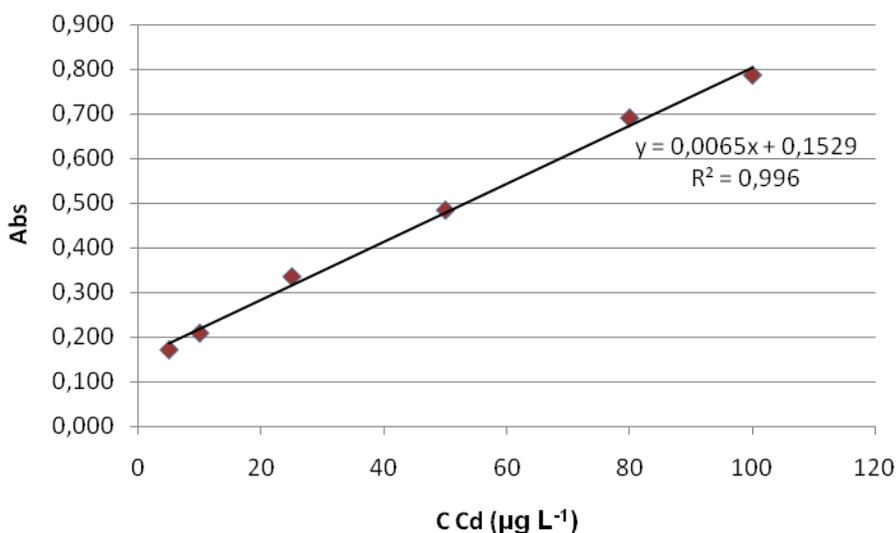


Figura 22: Curva de calibración para cadmio obtenida bajo las condiciones optimizadas de manera multivariada.

❖ Límite de detección

El límite de detección fue calculado como tres veces la señal de la desviación estándar de un conjunto de 10 mediciones de un patrón de $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$, entre la pendiente. El valor obtenido para la metodología desarrollada fue de $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$.

❖ Exactitud de la metodología propuesta

Para evaluar la exactitud de la metodología propuesta, igual que en el método univariado fueron evaluadas las muestras 1 y 2 con sus respectivos porcentajes de recuperación de las muestras contaminadas después de su digestión, los cuales se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9: Concentración de cadmio en las muestras de orina y sus respectivos porcentajes de recuperación, obtenidos mediante la optimización multivariada de los parámetros.

Muestra	C_M ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C_{PA} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C_D ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% R	% R_{promedio} (CV)
1	$42,91 \pm 0,02$	30,00	69,09	94,8	94 (2)
1	$36,41 \pm 0,04$	30,00	60,67	91,4	
1	$44,40 \pm 0,03$	30,00	71,08	95,5	
2	ND	40,00	37,42	93,6	95 (2)
2	ND	40,00	37,97	94,9	
2	ND	40,00	39,19	98,0	

M= muestra; PA= patrón agregado; D: determinada; R= recuperación

Los resultados del porcentaje de recuperación obtenidos en las muestras contaminadas después de su digestión se encuentran entre el 91 – 98 %, los cuales resultan satisfactorios.

Comparación de las metodologías de optimización univariada y multivariado

Para determinar si había diferencias significativas entre los valores óptimos de los factores optimizados mediante los métodos univariado y multivariado, fue realizada una *prueba t* al 95 % de confianza sobre los porcentajes de recuperación de las muestras bajo estudio. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 10: Comparación entre los métodos de optimización empleados.

	MUESTRA 1		MUESTRA 2	
	Univariado	Multivariado	Univariado	Multivariado
\bar{x} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	72*	67*	37*	38*
s ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2	6	1	1
n	2	3	2	3
s^2	2,66		0,50	
t_{exp}	1,79		2,62	
$t_{(P=0,05)}$	3,18		3,18	

* Concentración de cadmio determinada para tres réplicas de las muestras de orina contaminadas.

En los dos casos bajo estudio se obtuvo que el t_{exp} era menor que el $t_{teórico}$ ($P= 0,05$), por lo que se concluye que no existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos mediante los métodos univariado y multivariado.

Validación de la metodología optimizada

Las metodologías de optimización empleadas condujeron a resultados comparables estadísticamente. Sin embargo, dadas las ventajas que aporta la optimización mediante el método multivariado, se escogieron las condiciones obtenidas mediante este método como las óptimas para validar la metodología. Esta validación se realizó mediante la determinación de la concentración de cadmio en una muestra control.

Los resultados obtenidos en la determinación de cadmio en la muestra control Lyphochek Bio Rad Nivel 1, mostrados en la Tabla 10, se encuentran dentro del intervalo señalado para la muestra control ($4,8 - 7,2 \mu\text{g L}^{-1}$). Asimismo, el porcentaje de recuperación determinado para la metodología, es decir, considerando el proceso de digestión, estuvo en el 86 %. Este porcentaje de recuperación, aunque se encuentre dentro del intervalo que se considera satisfactorio (85- 115 %), indica la presencia de ciertas pérdidas en el proceso de digestión.

Tabla 11: Porcentajes de recuperación obtenidos en la determinación de cadmio en la muestra control de orina Lyphochek Bio Rad Nivel 1.

Réplicas	C _D (µg L ⁻¹)	C _E (µg L ⁻¹)	% R
3	5,16 ± 0,05	6,0 (4,8 – 7,2)	86 ± 2

D: determinada; C= certificada; R= recuperación

Los resultados obtenidos muestran que la celda de reacción evaluada, re-diseñada y operada bajo las condiciones de análisis optimizadas, permite la obtención del vapor metálico de cadmio y su determinación en muestras de orina de manera cuantitativa y con una buena precisión. En lo que refiere a los límites de detección obtenidos, éstos podrían ser mejorados realizando modificaciones adicionales dirigidas hacia la disminución del volumen muerto que diluye el vapor metálico generado.

CONCLUSIONES

- ❖ La celda de reacción diseñada en el laboratorio de Espectroscopia Atómica de la Universidad Simón Bolívar y la metodología de análisis optimizada permitieron la determinación cuantitativa y reproducible de cadmio en muestras de orina mediante CV-AAS empleando pequeños volúmenes de muestra.
- ❖ El diseño de celda evaluado y su ensamblaje con el separador gas-líquido proporcionan señales libres de efectos memoria.
- ❖ La modificación realizada al separador gas- líquido, permitió un mejor control en cuanto a la formación de burbujas. Sin embargo dicha modificación puede ser responsable, en parte, de los elevados límites de detección obtenidos.
- ❖ La metodología de optimización multivariada permite obtener mayor información en menor número de experiencias.
- ❖ Los resultados de concentración de Cd y porcentaje de recuperación obtenidos mediante las metodologías optimizadas mediante los modos univariados y multivariados no presentaron diferencias significativas ($P=0,05$).
- ❖ El límite de detección instrumental obtenido fue de $1,11 \mu\text{g L}^{-1}$, el cual puede ser mejorado disminuyendo la dilución de la muestra en el procedimiento de digestión y realizando modificaciones adicionales de la celda para disminuir el volumen muerto que diluye el vapor metálico generado.
- ❖ Mediante la validación de la metodología a través de las figuras de mérito correspondientes, se determinó que ésta fue utilizada apropiadamente y que los resultados obtenidos están garantizados analíticamente.

BIBLIOGRAFIA

- [1] The Center for International Environmental Law (CIEL), (2008), **“Pb and Cd need for international attention”**. www. Visitada en marzo del 2008.
- [2] Dedina J. y Tselev D. (1995). **“Hydride generation atomic absorption spectrometry”**, John Wiley & Sons. Vol 130, , England.
- [3] Nakahara T., (2005), **“Development of Gas-phase sample-introduction techniques for analytical atomic spectrometry”**. Analytical Sciences, Mayo, 21, 477-484.
- [4] Yan X. y Ni Z. (1994) **“Vapour generation atomic absorption spectrometry”**. Analitica Chimica Acta, 291, 89-105.
- [5] Bendl R., Madden J., Regan A., y Fitzgerald N., (2006), **“Mercury determination by cold vapor atomic absorption spectrometry utilizing UV photoreduction”**. Talanta, 68, 1366–1370.
- [6] Zhang Y., y Adeloju S. (2008), **“A novel sequential injection – Cold vapour absorption spectrometry system for rapid and reliable determination of Mercury”**. Talanta, 74, 951-957.
- [7] Cacho J., Beltran I., y Nerin C., (1989), **“Generation of a volatile cadmium species in an organic medium”**, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 4, 661-663.
- [8] Sanz-Medel A., Valdes-Hevia M., Bordel N., y Fernández M., (1995), **“ Generation of cadmium atoms at room temperature using vesicles and its application to cadmium determination by cold vapor atomic spectrometry”**., Analytical Chemistry, July, 67, 2216-2223.
- [9] Guo X., y Guo X., (1995). **“Determination of Cadmium at ultratrace levels by cold vapor atomic absorption spectrometry”**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 10, 987-991.
- [10] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), (1997), **“Toxicological profile for Cadmium”**. www.atsdr.cdc.gov/substances/cadmium. visitada el 11 de marzo del 2008.
- [11] Armenta M., y Ríos C. (2007), **“Cadmium Neurotoxicity”**. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23, 350-358.

- [12] Material Safety Data Sheet (MSDS). **Cadmium**. www.sciencelab.com/xMSDS-Cadmium-9923223. Visitada el 10 de marzo del 2008.
- [13] World Health Organization (WHO). **Cadmium Review**. (2003). www.who.int/entity/ifcs/documents/forums/forum5/nmr_cadmium.pdf. visitada el 26 de marzo del 2008.
- [14] Il'yasova D., y Schwartz G., (2005), "**Cd and renal cancer**". Toxicological and applied Pharmacology, 207, 179-186.
- [15] Occupational Safety and Health Administration (OSHA). **Cadmium**, (2004).
- [16] www.iarc.fr/monographs. visitada el 4 de marzo del 2008.
- [17] Skoog D., Holler F., y Niean T., (2001). "**Principios de Análisis Instrumental**", Quinta edición. Ed Mc Graw Hill. España.
- [18] Suleiman J., Hu B., Huang C., y Zhang N., (2008), "**Determination of Cd, Co, Ni and Pb in biological samples by microcolumn packed with black Stone (Pierre noire) online coupled with ICP-OES**", Journal of Hazardous Materials, Enero, 1-8.
- [19] Vieira M., Ribeiro A., Dias L., Curtius A., (2005) "**Determination of Cd, Hg, Pb and Se in sediments slurries by isotopic dilution calibration ICP-MS after chemical vapor generation using an on-line system or retention in an electrothermal vaporizer treated with iridium**". Spectrochimica Acta, 60, 643-652.
- [20] Ritschdorff E., Fitzgerald Neil., Mclaughlin R., y Brindle Ian. (2005). "**The use of a Multimode Sample Introduction System for the simple and rapid determination of cadmium by chemical vapour generation atomic absorption spectrometry**". Spectrochimica Acta, Part B, 60, 139-143.
- [21] Ebdon L., Goodall, P y Hill S., (1993), "**Ultra-trace determination of cadmium by Vapour Generation Atomic Fluorescence Spectrometry. Journal of analytical atomic spectrometry**", Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Agosto, Vol 8, 723-729
- [22] Welz B., y Sperling M., (1999). "**Atomic Absorption Spectrometry**". Tercera edición. Ed Wiley-VCH. Alemania.
- [23] Sanz-Medel A., (1990). "**Cuadernos de ciencias y técnicas ambientales**". Ed. Novoprint, SA. Barcelona. Vol 2, 67-121.
- [24] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)., (1992). "**Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-XIII. Terms related to chemical vapour generation**". 262-264.

- [25] Manzoori J., Abdolmohammad-Zadeh H., y Amjadi M. (2007). **“Ultratrace determination of cadmium by cold vapor atomic absorption spectrometry after preconcentration with a simplified cloud point extraction methodology”**. Talanta, 71, 582-587.
- [26] Sun H-W., Suo R. (2004) **“Enhancement reagents for simultaneous vapour generation of zinc and cadmium with intermittent flow system coupled to atomic fluorescence spectrometry”**. Analytical Chimica Acta, 509, 71-76.
- [27] Camara C., (1990). **“Cuadernos de ciencias y técnicas ambientales”**. Ed. Novoprint, SA. Barcelona. Vol 2, 237-290.
- [28] Dedina J. y Tselev D. (1995). **“Hydride generation atomic absorption spectrometry”**, John Wiley & Sons. Vol 130, , England.
- [29] Yan X. y Ni Z. (1994) **“Vapour generation atomic absorption spectrometry”**. Analítica Chimica Acta, 291, 89-105.
- [30] Carrion N. y Murillo M. **“Generación de hidruros en espectroscopia de plasmas: avances en el desarrollo instrumental”**. Revista de la Sociedad Venezolana de Química, Volumen 25, N° 3, julio-septiembre (2002).
- [31] Murillo L. (2006) **“Desarrollo de nuevas celdas de reacción para la generación de compuestos volátiles y su determinación por espectroscopia de absorción atómica”**. Anteproyecto del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Química. Sartenejas.
- [32] Hwang T., y Jiang S. (1997). **“Determination of Cadmium by flow injection isotope dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Vapour Generation Sample Introduction”**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Mayo, 12, 579-584.
- [33] Manual de operación del sistema generador de hidruro de mercurio (MHS –10 Mercury) Perkin- Elmer., (1978). Alemania, 2-4.
- [34] D’Ulivo A., Mester Z., Sturgeon R., (2005), **“The mechanism of formation of volatile hydrides by tetrahydroborate (III) derivatization: A mass spectrometric study performed with deuterium labeled reagents”**. Spectrochimica Acta. Part B, 60, 423-438.

- [35] Feng Y., Sturgeon R., Lam J., D'Ulivo A. (2005). **“Insights into the mechanism of chemical vapor generation of transition and noble metals”**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 20, 255-265.
- [36] Vargas-Razo C. y Tyson J.F. (2000). **“Determination of cadmium by flow injection-chemical vapor generation- atomic absorption spectrometry”**. Fresenius' Journal Anal, Chem. 36, 182-190.
- [37] McLaughlin R., y Brindle I., (2002). **“A new sample introduction system for atomic spectrometry combining vapour generation and nebulization capacities”**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 17, 1540-1548.
- [38] Maleki N., Safavi A., y Ramezani Z., (1999)., **“Determination of lead by hydride generation atomic absorption spectrometry (HG AAS) using a solid médium for generation hydride”**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 14, 1227-1230.
- [39] Alizo D., Domínguez J., Morales I. y Alvarado J. (2006). **“Modificación y evaluación de un horno de microondas doméstico para la digestión de muestras de orina y sangre”**. Ciencia, 14, 401-407.
- [40] Jiménez J. (2004). **“Determinación de Cd, Hg, Pb, Pt y Rh en muestras de sangre mediante absorción y emisión atómica”**. Caracas, Departamento de Química. Proyecto de Grado para optar al título de licenciado en Química de la USB. Venezuela.
- [41] Erber D., Quick L., Winter F., y Cammann K., (1995). **“Investigation for the determination of lead by in situ hydride trapping within a graphite electrothermal atomizer for routine analysis”**. Talanta 42(7): 927-936.
- [42] Garrido M., Muños-Olivas R., y Cámara C., (1998). **“Interference removal for cadmium determination in waste wáter and sewage sludge by flow injection cold vapor generation atomic absorption spectrometry”**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 13, 1145-1149.
- [43] Otto Matthias. (1999). **“Chemometrics”**, Wiley- VCH, Germani.

Apéndice 1: Experiencias del diseño Box Behnken de cuatro factores, dos niveles.

Diseño factorial: Box Behnken 4 factores dos niveles					
Factores y niveles codificados					
Exp.	Bloque	A: Acido	B: Cobalto	C: Tiourea	D: Reductor
1	1	-1	0	0	1
2	1	0	1	1	0
3	1	0	1	0	1
4	1	1	1	0	0
5	1	1	0	0	-1
6	1	-1	0	1	0
7	1	0	0	0	0
8	1	0	1	-1	0
9	1	0	-1	-1	0
10	1	1	0	0	1
11	1	1	0	1	0
12	1	0	0	-1	-1
13	1	-1	0	0	-1
14	1	-1	1	0	0
15	1	0	0	1	1
16	1	0	0	1	-1
17	1	0	0	0	0
18	1	0	-1	0	-1
19	1	1	-1	0	0
20	1	0	0	0	0
21	1	0	1	0	-1
22	1	0	-1	0	1
23	1	0	-1	1	0
24	1	0	0	-1	1
25	1	1	0	-1	0
26	1	-1	-1	0	0
27	1	-1	0	-1	0
28	2	-1	0	0	1
29	2	0	1	1	0
30	2	0	1	0	1
31	2	1	1	0	0
32	2	1	0	0	-1
33	2	-1	0	1	0
34	2	0	0	0	0
35	2	0	1	-1	0
36	2	0	-1	-1	0
37	2	1	0	0	1
38	2	1	0	1	0
39	2	0	0	-1	-1
40	2	-1	0	0	-1
41	2	-1	1	0	0
42	2	0	0	1	1
43	2	0	0	1	-1
44	2	0	0	0	0
45	2	0	-1	0	-1
46	2	1	-1	0	0
47	2	0	0	0	0
48	2	0	1	0	-1
49	2	0	-1	0	1
50	2	0	-1	1	0
51	2	0	0	-1	1
52	2	1	0	-1	0
53	2	-1	-1	0	0
54	2	-1	0	-1	0

Apéndice 2: Valores estimados de los efectos considerados en el diseño Box Behnken, empleado una muestra de orina contaminada con $40 \mu\text{g L}^{-1}$.

average	=	0,343617	+/-	0,0296934
A:Acido	=	0,109417	+/-	0,0296934
B:Co	=	0,119875	+/-	0,0296934
C:Tiourea	=	0,098275	+/-	0,0296934
D:Reductor	=	0,263533	+/-	0,0296934
AA	=	-0,277354	+/-	0,0445401
AB	=	-0,0527	+/-	0,0514305
AC	=	-0,06665	+/-	0,0514305
AD	=	0,0294	+/-	0,0514305
BB	=	-0,0660667	+/-	0,0445401
BC	=	0,111725	+/-	0,0514305
BD	=	0,2335	+/-	0,0514305
CC	=	-0,0866167	+/-	0,0445401
CD	=	0,03755	+/-	0,0514305
DD	=	-0,203204	+/-	0,0445401
block	=	-0,00184444	+/-	0,0197956

Apéndice 3 Análisis de varianzas para valores de los efectos considerados en el diseño Box Behnken, empleando una muestra de orina contaminada con $40 \mu\text{g L}^{-1}$.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acido	0,071832	1	0,071832	13,58	0,0007
B:Co	0,0862201	1	0,0862201	16,30	0,0003
C:Tiourea	0,0579479	1	0,0579479	10,95	0,0021
D:Reductor	0,416699	1	0,416699	78,77	0,0000
AA	0,205134	1	0,205134	38,78	0,0000
AB	0,00555458	1	0,00555458	1,05	0,3120
AC	0,00888444	1	0,00888444	1,68	0,2028
AD	0,00172872	1	0,00172872	0,33	0,5709
BB	0,0116395	1	0,0116395	2,20	0,1462
BC	0,024965	1	0,024965	4,72	0,0361
BD	0,109045	1	0,109045	20,61	0,0001
CC	0,0200065	1	0,0200065	3,78	0,0592
CD	0,00282	1	0,00282	0,53	0,4698
DD	0,110112	1	0,110112	20,81	0,0001
blocks	0,0000459267	1	0,0000459267	0,01	0,9263
Total error	0,201027	38	0,00529019		
Total (corr.)	1,23978	53			

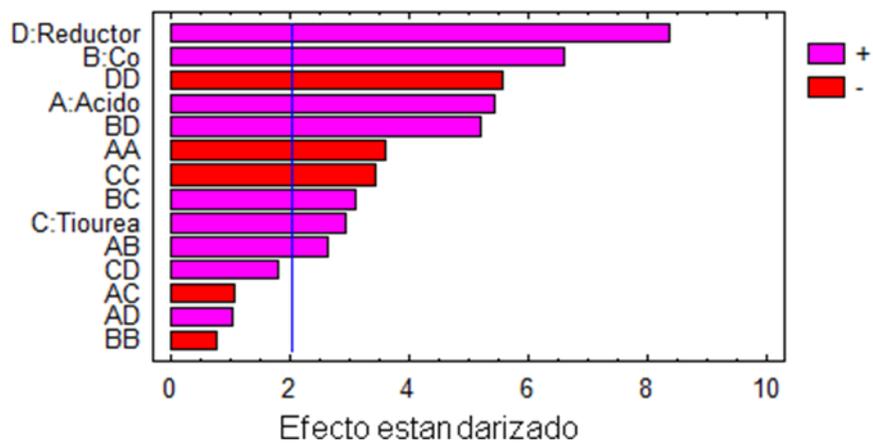
Apéndice 4: Valores estimados de los efectos considerados en el diseño Box Behnken, empleando un patrón acuoso de $40 \mu\text{g L}^{-1}$.

average	=	0,29385	+/-	0,0272814
A:Acido	=	0,148617	+/-	0,0272814
B:Co	=	0,179892	+/-	0,0272814
C:Tiourea	=	0,0804333	+/-	0,0272814
D:Reductor	=	0,228542	+/-	0,0272814
AA	=	-0,147537	+/-	0,0409221
AB	=	0,124225	+/-	0,0472528
AC	=	-0,049925	+/-	0,0472528
AD	=	0,04905	+/-	0,0472528
BB	=	-0,031425	+/-	0,0409221
BC	=	0,1462	+/-	0,0472528
BD	=	0,2461	+/-	0,0472528
CC	=	-0,140537	+/-	0,0409221
CD	=	0,085175	+/-	0,0472528
DD	=	-0,227425	+/-	0,0409221
block	=	-0,0112741	+/-	0,0181876

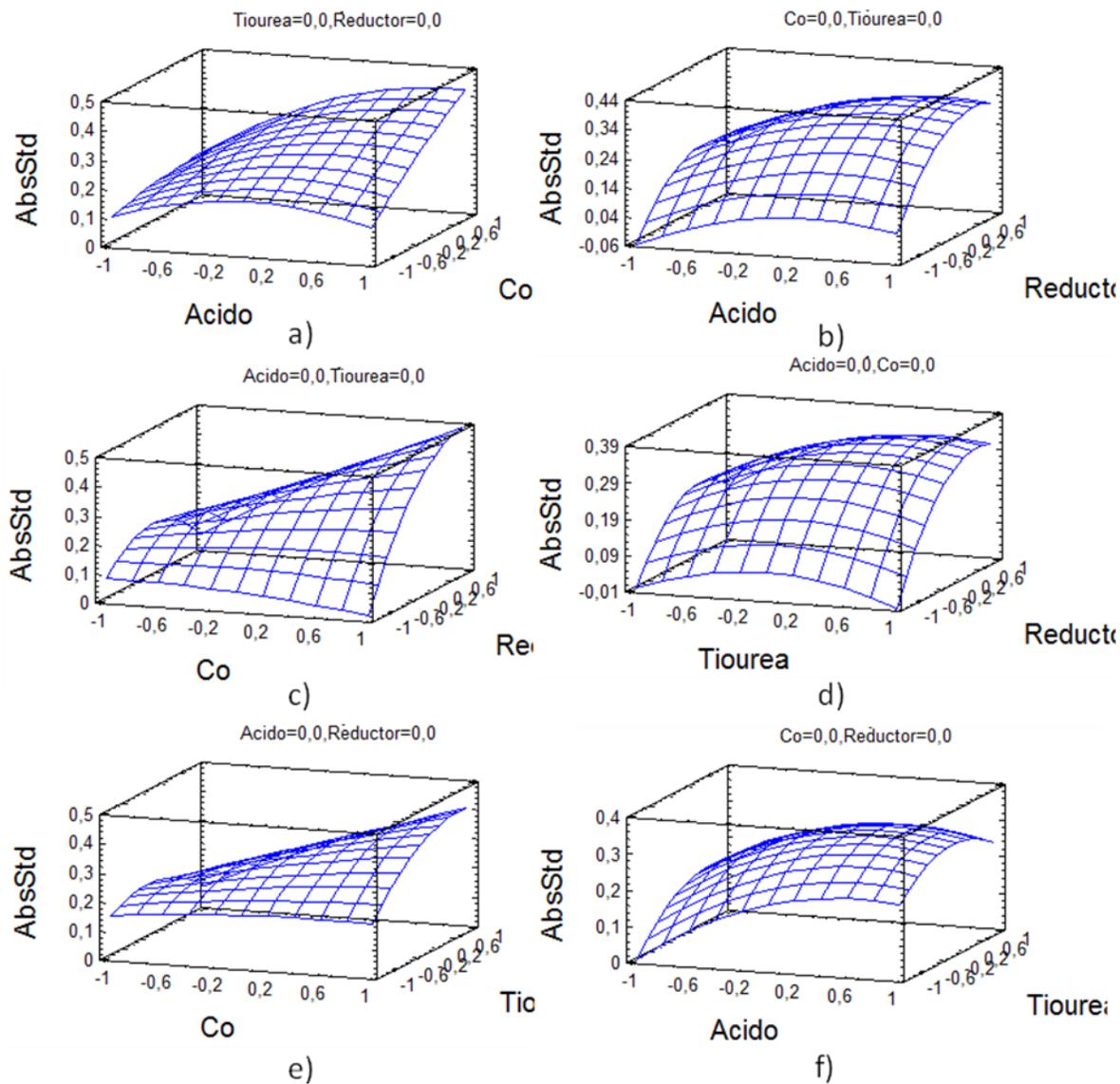
Apéndice 5: Análisis de varianzas para valores de los efectos considerados en el diseño Box Behnken, empleado un patrón acuoso de $40 \mu\text{g L}^{-1}$.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Acido	0,132521	1	0,132521	29,68	0,0000
B:Co	0,194166	1	0,194166	43,48	0,0000
C:Tiourea	0,0388171	1	0,0388171	8,69	0,0054
D:Reductor	0,313388	1	0,313388	70,18	0,0000
AA	0,0580462	1	0,0580462	13,00	0,0009
AB	0,0308637	1	0,0308637	6,91	0,0123
AC	0,00498501	1	0,00498501	1,12	0,2974
AD	0,00481181	1	0,00481181	1,08	0,3058
BB	0,00263341	1	0,00263341	0,59	0,4473
BC	0,0427489	1	0,0427489	9,57	0,0037
BD	0,12113	1	0,12113	27,12	0,0000
CC	0,0526688	1	0,0526688	11,79	0,0015
CD	0,0145096	1	0,0145096	3,25	0,0794
DD	0,137926	1	0,137926	30,89	0,0000
blocks	0,00171591	1	0,00171591	0,38	0,5390
Total error	0,169695	38	0,00446565		
Total (corr.)	1,24685	53			

Apéndice 6: Gráfica de Pareto de los efectos de los factores A, B, C, y D involucrados en la generación del vapor frío de cadmio empleando un patrón acuoso de $40 \mu\text{g L}^{-1}$.



Apéndice 7: Superficies de respuesta obtenidas en el patrón acuoso. Nota: la concentración de las lecturas se muestra en valores codificados.



Apéndice 8: Ecuaciones empleadas para el cálculo de las figuras de mérito.

❖ **Sensibilidad**, fue determinada en función del coeficiente de varianza (CV).

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

❖ **Porcentaje de recuperación:**

$$\% R = \frac{C_{\text{muestra contaminada}} - C_{\text{muestra}}}{C_{\text{contaminación}}}$$

❖ **Comparación de un valor experimental con un valor verdadero en el caso de la muestra control de orina.**

$$t = \frac{\bar{x} - \mu\sqrt{n}}{s}$$

❖ **Límite de detección**

$$LD = \frac{3 \times s}{b}$$